

Université de Montréal

**Systeme de recombinaison Xer chez**  
***Staphylococcus aureus***

par

Alexandra Gustinelli

Département de microbiologie et immunologie  
Faculté de Médecine

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

Aout, 2011

© Alexandra Gustinelli, 2011

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures et postdoctorales

Ce mémoire intitulé :

Systeme de recombinaison Xer chez *Staphylococcus aureus*

Présenté par :

Alexandra Gustinelli

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Patrick Hallenbeck, président-rapporteur

Dr George Szatmari, directeur de recherche

Dr Marc Drolet, membre du jury

## Résumé

Le système de recombinaison Xer est impliqué dans la monomérisation des réplicons bactériens, comme les plasmides et les chromosomes, dans une grande variété de bactéries. Ce système est un système de recombinaison site-spécifique composé de deux tyrosine recombinases, soit XerC et XerD. Ils agissent ensemble afin de convertir les chromosomes dimériques en monomères en agissant à un site spécifique près du terminus de la réplication, appelé le site *dif*. Les gènes Xer et leur site d'action sont identifiés dans plusieurs bactéries gram positives et gram négatives. *Staphylococcus aureus* représente une bactérie gram positive qui contient un système XerCD/*dif*. Elle est impliquée dans plusieurs maladies humaines, tels que des infections cutanées, des gastroentérites, et le syndrome de choc toxique, pour en nommer quelques unes. Bien que les gènes codant les protéines XerC et XerD ont été identifiés, il y a beaucoup d'inconnu sur leur mode d'action au site *dif*. Des mutations dans XerC ont été obtenues, mais aucune dans XerD, suggérant que ce gène pourrait être essentiel pour cet organisme. Les études présentées dans ce mémoire ont permis de commencer à mieux caractériser XerD de *S. aureus*, en séquençant le gène et en faisant des tests de liaison à l'ADN. Elles ont montré que la recombinase XerD se lie au site *dif* d'*Escherichia coli* seul et de façon coopérative avec la recombinase XerC d'*E. coli*. XerD de *S. aureus* est, aussi, efficace dans la complémentation de XerD muté d'*E. coli* dans la réaction de recombinaison chromosomique. Cependant, elle ne démontre pas cette même capacité de complémentation lors de la recombinaison plasmidique aux sites *cer*.

**Mots-clés** : Recombinaison spécifique de site/ tyrosine recombinase/ XerD/ *dif*/  
*Staphylococcus aureus*

## Abstract

The Xer recombination system is involved in the monomerisation of bacterial replicons, such as plasmids and chromosomes, in a wide variety of bacteria. This system is a site-specific recombination system comprised of two tyrosine recombinases, XerC and XerD, which act in concert to convert dimeric chromosomes to monomers by acting at a specific site near the terminus of replication called the *dif* site. Xer genes and their site of action have been identified in many gram positive and gram negative bacteria. *Staphylococcus aureus* represents a gram positive bacterium containing a XerCD/*dif* system. It is a bacteria implicated in many human diseases, such as skin infections, gastroenteritis and toxic shock syndrome, to name a few. Although the genes encoding the XerC and XerD proteins have been identified, not much is known about their mode of action on the *dif* site. Mutations in *xerC* have been obtained, but none in *xerD*, suggesting that this gene may be essential for this organism. The work presented in this paper has allowed us to better understand the XerD protein of *S. aureus*, not only in the sequencing of the *xerD* gene but also in the performing of DNA binding assays. It has been shown that XerD binds to the *dif* site of *E. coli*, not only alone but also in cooperativity with *E. coli* XerC. *S. aureus* XerD is also capable of complementing the mutated XerD protein in *E. coli* when it comes to chromosomal recombination. However, it does not demonstrate this same ability to complement XerD regarding recombination at the plasmidic *cer* sites.

**Keywords** : Site-specific recombination/ tyrosine recombinase/ XerD/ *dif*/  
*Staphylococcus aureus*

## 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 La famille des résolvases/invertases.....	6
1.3 La famille des lambda-intégrases.....	9
1.3.1 La réaction de recombinaison.....	10

### 2. La recombinaison site spécifique de type Xer.....12

2.1. Généralités.....	12
2.2 XerC et XerD.....	15
2.2.1 XerC.....	17
2.2.2 XerD.....	19
2.2.3. Le mécanisme catalytique de XerC et XerD/Structure et Fonction.....	21
2.3. Le site d'action des recombinases de type Xer.....	24
2.3.1 Site de recombinaison chromosomique.....	27
2.3.1.1 Site <i>dif</i> de <i>Escherichia coli</i> .....	27
2.3.1.1.1 Structure.....	30
2.3.1.1.2 Lien : recombinaison, division cellulaire et structure chromosomique.....	32
2.4 Facteurs accessoires .....	35

2.4.1. FtsK.....	35
2.5 Régulation de la Recombinaison de type Xer.....	43
2.5.1 Contrôle de la Recombinaison Homologue.....	44
3. <i>Staphylococcus aureus</i> .....	47
4. <b>Projet de Maîtrise</b> .....	51

## **Chapitre II : ARTICLE** .....53

<b>Abstract</b> .....	54
<b>1.Introduction</b> .....	55
<b>2. Materials and Methods</b> .....	59
2.1. Bacterial strains and plasmids.....	59
2.2. Growth conditions and DNA manipulations.....	60
2.3. Polymerase chain reaction (PCR) conditions.....	61
2.4. Protein overexpression.....	62
2.5. DNA-binding assay.....	63
2.6. Complementation assays.....	64
<b>3. Results and Discussion</b> .....	65
<b>4. Acknowledgements</b> .....	74
<b>5. References</b> .....	75
<b>6. Figure Legends</b> .....	80

## **Chapitre III: DISCUSSION**

<b>1. Le clonage du gene <i>xerD</i> de <i>Staphylococcus aureus</i></b> .....	94
<b>2. Liaison à l'ADN</b> .....	97
<b>3. Liaison coopérative</b> .....	100
<b>4. Complémentation</b> .....	102
<b>5. Autres expériences</b> .....	105
<b>6. Perspectives</b> .....	107

**REFERENCES**.....112

**REMERCIEMENTS**.....xv

# LISTE DES TABLEAUX

## CHAPTER I : INTRODUCTION

TABLEAU 1 : Alignement des séquences Xer des plasmides et plusieurs sites <i>dif</i> des bactéries différentes.....	26
---	----



## LISTE DES FIGURES

### CHAPITRE I : INTRODUCTION

FIGURE 1 : Mécanisme de recombinaison site-spécifique.....	6
FIGURE 2 : Mode d'action des résolvases/invertases.....	8
FIGURE 3 : Échange de brins séquentiel par les recombinases à tyrosine.....	11
FIGURE 4 : Structure cristallisée de XerD de <i>E. coli</i> .....	23
FIGURE 5 : Modèle du complexe entre XerC, XerD, et l'ADN.....	24
FIGURE 6 : Positions de sites Ter chez <i>E. coli</i> .....	29
FIGURE 7 : Séquence <i>dif</i> <i>E. coli</i> .....	32
FIGURE 8 : Modèle de « co-location ».....	34
FIGURE 9 : Schéma de FtsK de <i>E. coli</i> .....	37
FIGURE 10 : Voies de Recombinaison au site <i>dif</i> de type Xer dépendantes et indépendantes de FtsK.....	41
FIGURE 11 : Les chromosomes dimères et le cycle cellulaire.....	46

### CHAPITRE II : ARTICLE

FIGURE 1: Amino acid alignment of <i>E. coli</i> and <i>S. aureus</i> C-terminal domains of XerC and XerD.....	83
FIGURE 2 : Alignment of <i>dif</i> recombination sites.....	84
FIGURE 3: Gel retardation analysis of binding of XerD of <i>S. aureus</i> with <i>ecdif</i> .....	85
FIGURE 4: Gel retardation analysis of cooperative binding of <i>ecXerC</i> and <i>ecXerD</i> with <i>ecdif</i> .....	86
FIGURE 5: Gel retardation analysis of cooperative binding of <i>ecXerC</i> and <i>saXerD</i> with <i>ecdif</i> .....	88
FIGURE 6: Gel retardation analysis of binding of XerC of <i>C. crescentus</i> with <i>ecdif</i> .....	90

FIGURE 7: Gel retardation analysis of cooperative binding of <i>ccXerC</i> and <i>saXerD</i> with <i>ecdif</i> .....	91
FIGURE 8: Analysis of Complementation of <i>E. coli xerD</i> mutant with <i>S. aureus XerD</i> .....	92
 <b>CHAPITRE III: DISCUSSION</b>	
FIGURE 12 : Alignement des protéines XerD de <i>E. coli</i> et <i>S.</i> <i>aureus</i> .....	95
FIGURE 13 : Induction et purification de XerD de <i>S. aureus</i> .....	97
FIGURE 14 : Alignement de la région d'interaction avec FtsK des protéines XerD de <i>E. coli</i> et <i>S. aureus</i> .....	104
FIGURE 15 : Construction de mutants d'insertion.....	107
FIGURE 16 : Contexte des gènes codant les recombinases XerC et XerD chez <i>B. subtilis</i> et <i>S. aureus</i> .....	110

## Liste des Abréviations

### ACIDES AMINÉS

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

### UNITÉS DE MESURE

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

**AUTRES**

aa: acides aminés

Ap: ampicilline

ATP: adénosine triphosphate

ATPase: adénosine triphosphatase

BSA: bovine serum albumin

*ccdif*: site *dif* de *Caulobacter*

*ccXerC*: XerC de *Caulobacter crescentus*

*ccXerD*: XerD de *Caulobacter crescentus*

C-terminale: carboxy-terminale

DAPI: 4', 6-diamidino-2-phénylindole

*ecdif*: site *dif* de *Escherichia coli*

*ecXerC*: XerC de *Escherichia coli*

*ecXerD*: XerD de *Escherichia coli*

DIG: digoxygénine

ADN: acide désoxyribonucléique

EDTA: acide éthylènediaminetétracétique

HJ: junction de Holliday

IPTG: isopropyl B-D thiogalactopyranoside

LB: Luria-Bertani

MBP: maltose binding protein

NaCl: chlorure de sodium

NEB: New England Biolabs

PCR: réaction en chaîne par polymérase

SDS: sodium dodecyl sulfate

*sadif*- site *dif* *Staphylococcus aureus*

*saXerD*: XerD de *Staphylococcus aureus*

TBE: tampon tris-borate EDTA

Ts: thermosensible

$\alpha$ : alpha  $\beta$ : bêta  $\lambda$ : lambda

UV: ultraviolet

Y: tyrosine

$\lambda$  Int: intégrase de phage  $\lambda$

3'OH: extrémité trois' hydroxyle

3'PO<sub>4</sub>: extrémité trois' phosphate

# *Chapitre I*

## **Introduction**

### **1. Recombinaison site-spécifique**

#### **1.1 Généralités**

La recombinaison génétique joue un rôle primordial dans la biologie et le métabolisme de l'ADN. Elle génère la diversité génomique, aide à la propagation et à la maintenance des génomes, confère un contrôle dans l'expression des gènes, et enfin contribue à la réparation de l'ADN. La réaction de la recombinaison consiste en la brisure et la religation de l'ADN dans de nouvelles combinaisons. L'échange génétique a lieu soit entre deux molécules d'ADN provenant de l'ADN parental, soit entre deux segments d'ADN au sein de la même molécule. Il existe deux types d'échange génétique : la recombinaison entre deux molécules d'ADN ayant une grande homologie, connu comme étant la recombinaison homologue et la recombinaison dite site-spécifique entre deux courts segments d'ADN possédant une homologie limitée.

Plus spécifiquement, la recombinaison homologue est utilisée pour réparer des brisures dans l'ADN et contribue à la production de la diversité bactérienne. Lors d'un bris double brin, la voie RecBCD répare l'ADN, tandis

qu'avec un bris simple brin, la voie RecF est utilisée. Les deux voies incluent une série de réactions dans lesquelles des simples brins sont échangés entre deux molécules entrecroisées d'un duplex d'ADN puis sont séparées par une coupure afin de les restaurer à leur état double brin normale (Rocha et *al.*, 2005). En général, la recombinaison homologue montre un degré de précision similaire à celle de la recombinaison site-spécifique; cependant la recombinaison homologue n'a pas lieu à des sites spécifiques contrairement à la recombinaison dite « site-spécifique ». Il s'ensuit que l'échange de brins peut se faire n'importe où sur les deux chromosomes homologues par des protéines qui sont ni site-spécifique ni séquence-spécifique (Camerini-Otero et Hsieh, 1995).

Dans la recombinaison site-spécifique, des protéines de recombinaison catalysent la coupure et la religation de deux segments d'ADN différents à des séquences spécifiques. La réaction commence avec la liaison de la recombinaison aux deux sites de recombinaison. Cette liaison mène à la formation d'un complexe synaptique, ce qui amène les deux sites de recombinaison ensemble avec les sites de « *crossover* » juxtaposés. Par la suite, la recombinaison catalyse le clivage, l'échange de brins, et la religation de l'ADN au sein du complexe synaptique. Une fois la réaction complétée, le complexe synaptique se défait, relâchant ainsi les produits issus de la recombinaison. Pour ce qui est des sites de recombinaison, ce sont des séquences d'ADN entre 30 et 200 paires de

bases n'ayant qu'une homologie très limitée (Kolb, 2002). De plus, elles sont légèrement asymétriques, permettant à la recombinase de faire la différence entre le demi-site de gauche et le demi-site de droite. Les sites consistent en deux motifs avec une symétrie de répétition inversée partielle, auxquels la recombinase se lie, et qui sont flanqués par une séquence centrale d'enjambement où la réaction de recombinaison se fait. Le demi-site de gauche et le demi-site de droite sont habituellement identiques; cependant il existe des exceptions, telles *attP* et *attB* de l'intégrase  $\lambda$  (Landy, 1989). Les recombinases sont les enzymes qui reconnaissent ces séquences spécifiques, les lient, et sont responsables des échanges de segments d'ADN lors de la recombinaison. Plus spécifiquement, ces enzymes clivent l'ADN par une attaque nucléophile d'une liaison phosphodiester, font l'échange des brins des deux ADN double brin impliqués, et effectuent la religation des brins d'ADN. Cette réaction n'implique ni la synthèse ni l'hydrolyse de l'ADN et ne requiert pas l'utilisation de l'ATP exogène (Kolb 2002). Alors que dans certains systèmes de recombinaison site-spécifique la présence d'une seule recombinase avec des sites de recombinaison suffisants pour accomplir toutes ces réactions, d'autres systèmes nécessitent des protéines accessoires ainsi que des sites accessoires.

La réaction catalysée par la recombinase peut mener à différents résultats, dépendamment de l'orientation et de la position relative des sites à

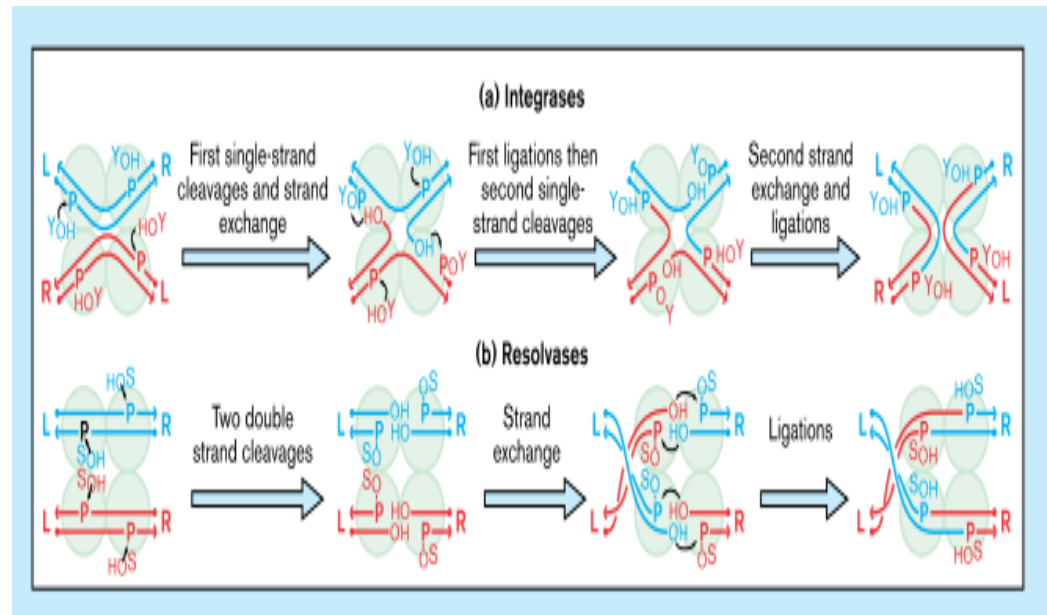
recombinaison, ainsi que de la spécificité innée du système de recombinaison site-spécifique. L'inversion ou excision de l'ADN flanqué par les deux sites a lieu lorsqu'il y a une recombinaison intramoléculaire entre des sites invertis ou directement répétés respectivement. La recombinaison entre des molécules d'ADN différentes donne une intégration d'une molécule dans l'autre.

Les systèmes de recombinaison site-spécifique sont hautement spécialisés et ont évolué pour ignorer les sites qui sont dans la « mauvaise » orientation, catalysant seulement un des différents types de réaction. De plus, ces systèmes sont très spécifiques, rapides, et efficaces, même devant des génomes parfois complexes des eucaryotes (Sauer, 1998). Souvent employés dans une variété de processus cellulaires, incluant la réplication du génome bactérien, la différenciation et pathogenèse, et le déplacement des éléments génétiques mobiles, les systèmes de recombinaison site-spécifique s'avèrent importants pour un grand nombre de fonctions biologiques (Nash, 1996).

Basé sur la similarité évolutionnaire et mécanistique, la plupart des recombinases site-spécifique font partie d'une des deux familles suivantes: la famille des recombinases à tyrosine et la famille des recombinases à sérine. La différence réside dans le résidu d'acide aminé nucléophile conservé qu'elles utilisent pour l'attaque de l'ADN et qui va le lier de façon covalente lors du processus d'échange de brins. La famille des recombinases à sérine est souvent connue comme étant la famille des résolvases/invertases tandis que les



recombinases à tyrosine sont connues comme faisant partie de la famille des intégrases, ce qui reflète le genre de réaction catalysée par les membres des familles. La famille des résolvases quant à elle inclut des résolvases codés par des transposons, tels la résolvases gamma-delta et la résolvases Tn3 ainsi que des invertases d'ADN tels que Hin et Gin. La famille des intégrases est composée du phage  $\lambda$ , le phage P1 Cre, et d'autres phages d'intégrases ainsi que les protéines bactériennes XerC et XerD, et la protéine FLP codé par la levure *S. cerevisiae* (Stark, 1995). Malgré le fait que les deux familles d'enzyme ne se ressemblent pas du point de vue structure protéique et mécanismes de réaction, les deux catalysent la réaction conservative de brisure-religation de l'ADN qui se fait par une transesterification à deux étapes dans laquelle des phosphodiester protéiques agissent en tant qu'intermédiaires de réaction.



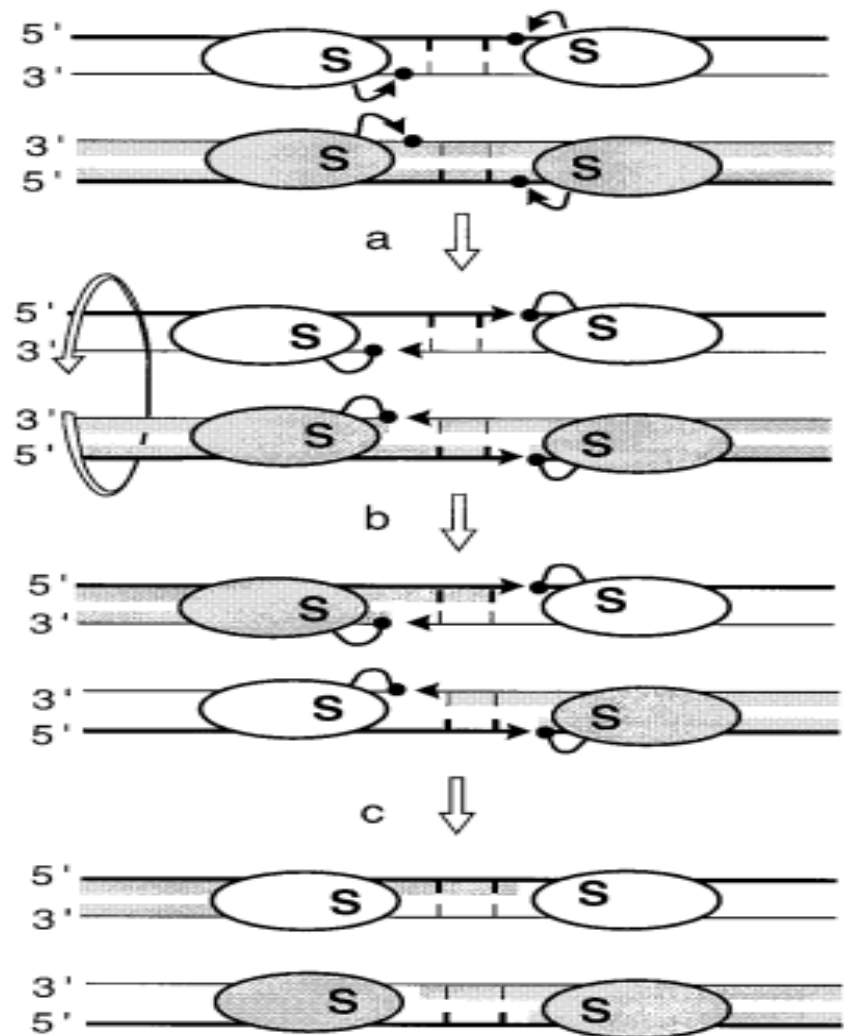
**Figure 1.** Mécanisme de recombinaison site-spécifique

(a) intégrase  $\lambda$  et ses analogues font des paires d'échange de brins simples de façon ordonné et séquentiel entre deux partenaires recombinantes ; le premier paire d'échange forme une jonction de Holliday, le deuxième paire fait la résolution de la jonction. La nucléophile utilisée pour le clivage et formation de l'intermédiaire recombinase-ADN covalent est une tyrosine conservé ( $Y_{OH}$ ). Les sites de clivage sur chaque duplexe d'ADN sont séparés par 6-12 pb avec un « stagger » au 5' et la tyrosine se lie au 3' phosphate (b) la résolvasse  $\gamma\delta$  et ses analogues font des brisures double brin chez les deux partenaires recombinantes, puis font un échange d'extrémités pour ensuite les rejoindre. La nucléophile de la resolvase est une sérine ( $S_{OH}$ ) qui clive l'ADN aux sites séparés par 2 pb avec un « stagger » au 3', attachant au 5' phosphate. Figure tirée de Grindley 1997 (avec permission).

## 1.2 La famille des résolvases/invertases

La famille des résolvases/invertases forment un groupe assez homogène dans lequel un résidu de serine conservé joue le rôle clé de catalyse. Il existe plus de 100 membres différents dans cette famille (Moldave 2005) avec des

tailles variant entre 180 à environ 800 résidus d'acide aminés (Smith et Thorpe, 2002), les plus connues étant les résolvases des transposons Tn3 et  $\gamma\delta$  ainsi que les invertases Gin du bactériophage Mu et Hin de *Salmonella sp* (Hatfull et Grindley, 1988). D'autres résolvases connues avec des structures résolues incluent la résolvasse gamma-delta (Sarkis et al., 2001), la sérine recombinase Hin (Dhar et al., 2009), et la recombinase Sin chez *Staphylococcus aureus* (Rowland et al., 2002). Les recombinases à sérine agissent via un clivage et échange des quatre brins de façon simultanée et concertée (Figure 2), ce qui diffère grandement des recombinases à tyrosine qui procèdent par une formation et résolution d'un intermédiaire de « jonction de Holliday », durant laquelle les brins d'ADN sont attachés de façon transitoire aux sous-unités de la recombinase via des liens phospho-tyrosine (Landy, 1989 ; Stark et al., 1992 ; Gopaul et Duyne, 1999 ; Chen et al., 2002). La particularité de ces recombinases réside dans le fait qu'elles requièrent le surenroulement de l'ADN selon une topologie spécifique permettant seulement la recombinaison intramoléculaire. De plus, le site d'enjambement, où a lieu l'échange des brins, n'est que de deux paires de bases et la sérine est celle qui effectue l'attaque nucleophilique, libérant ainsi une extrémité 3' OH pendant que la sérine est liée à l'extrémité 5' phosphate (Nash, 1996).



**Figure 2.** Mode d'action des résolvases/invertases. Les ovales représentent les sous-unités de la recombinase avec une sérine catalytique 'S'. Les lignes larges et minces représentent les brins supérieurs et inférieurs respectivement. Les lignes verticales représentent la région d'espace de 2 pb. Les flèches noires indiquent l'attaque nucléophile par des groupements hydroxyles. Les quatre brins d'ADN sont clivés (a), échangé par une rotation de 180° d'un demi-site (b) et reliés (c). Figure tirée de Hallet et Sherratt 1997 (avec permission).

### **1.3 Famille des Lambda-Intégrases**

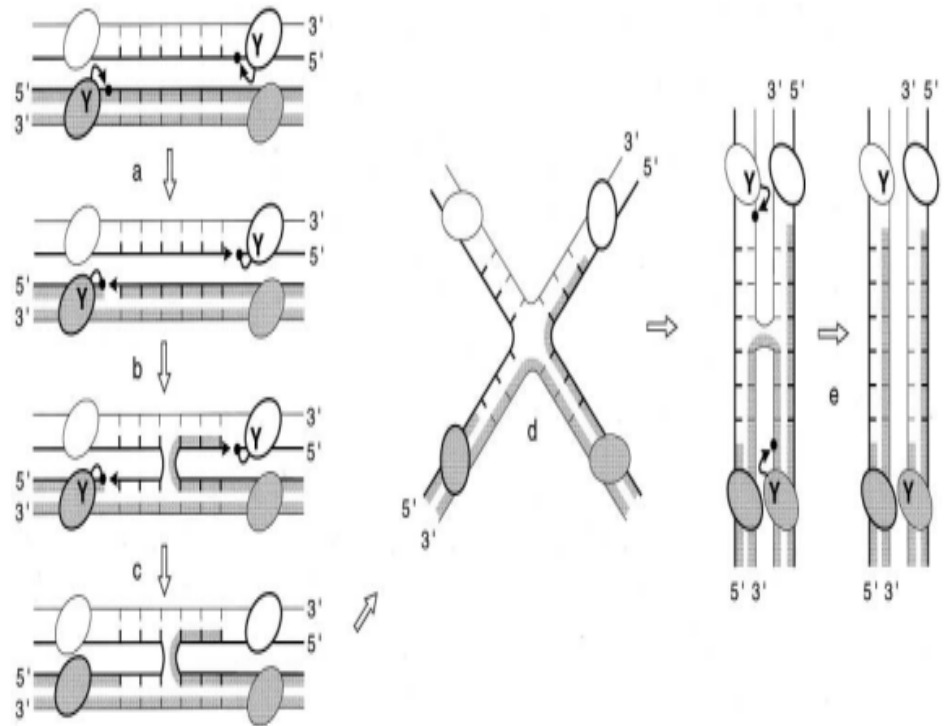
La famille des lambdas-intégrases comprend plus de 100 membres, identifiés sur la base de la similarité de séquence (Nunes-Düby et *al.*, 1998). Les recombinases de type tyrosine sont surtout retrouvées chez les procaryotes, mais il en existe aussi chez les archaea et même, plus rarement, chez les eucaryotes (Nunes-Düby et *al.*, 1998 ; Poulter et Goodwin, 2005). Les membres les plus notables inclut l'intégrase du bactériophage  $\lambda$  (Int) (Landy, 1989), les recombinases bactériennes XerC et XerD (Sherratt et *al.*, 1995), la recombinase Cre du bactériophage P1 (Hoess et *al.*, 1985), et la recombinase FIp de *Saccharomyces cerevisiae* (Sadowski, 1995). Ce qui caractérise toutes ces protéines en tant que recombinases à tyrosine est leur tétrade au site actif faite de deux arginines, une histidine, et une tyrosine (RHRY) qui catalyse la réaction de recombinaison (Argos et *al.*, 1986 ; Abremski et Hoess, 1992). Les recombinases effectuent la recombinaison site-spécifique en faisant l'échange d'une paire de brins d'ADN pour former l'intermédiaire d'une jonction d'*Holliday* (Craig, 1988), puis la résolution de la jonction d'*Holliday* en produits finaux par l'échange d'une deuxième paire de brins. Alors, contrairement aux recombinases de la famille des resolvases/invertases, les recombinases de la famille des  $\lambda$  intégrases font l'échange de deux brins d'ADN de façon séparés et séquentiel (Figure 1).

Malgré la grande divergence des protéines de cette famille de recombinaisons et une similarité limitée au niveau de la séquence des acides aminés, elles utilisent toutes le même mécanisme pour la réaction de recombinaison site-spécifique. En alignant les protéines de cette famille, la présence de seulement quelques motifs conservés liés à la fonction catalytique est mise en évidence (Nunes-Duby *et al.*, 1998 ; Esposito *et al.*, 1997). Cependant, des études structurales démontrent que le pli au niveau du site actif de tout le domaine est très bien conservé, même quand l'identité de la séquence hors la région du site actif n'est pas significative.

### **1.3.1 La réaction de recombinaison**

Afin d'initier le premier échange de brins, le résidu tyrosine du motif catalytique conservé RHRY attaque le phosphate scissile spécifique d'un brin (brin du haut) de chaque site de recombinaison, ainsi formant un complexe recombinaison-ADN (lien phosphotyrosyl) au 3' et générant une extrémité libre 5'-OH (Figure 3). Comparé au clivage par les recombinaisons résolvases/invertases, la polarité de ce clivage est inversée. À la deuxième étape, le lien phosphotyrosyl recombinaison-ADN est attaqué par l'extrémité 5'-OH du duplexe avoisinante pour générer une jonction mobile de quatre brins d'ADN, soit l'intermédiaire de la « jonction de Holliday », dans lequel seulement deux brins d'ADN sont recombinaisonnés. Dans le but de résoudre cet intermédiaire et compléter la réaction de recombinaison, les deux autres brins

(du bas) sont échangés en répétant le processus du clivage/religation 6 à 12 pb en aval du site de clivage du premier brin (Hallet et Sherratt, 1997).



**Figure 3.** Échange de brins séquentiel par les recombinases à tyrosine. Le modèle d'échange/isomérisation des brins est présenté. La lettre 'Y' représente la tyrosine catalytique conservée. Les ovales représentent les sous-unités des recombinases. Les lignes épais et minces sont les brins supérieurs et inférieurs des sites de recombinaison, respectivement. Les flèches noires indiquent l'attaque nucléophile des phosphates (points noirs) par les groupements hydroxyles (pointes de flèches). Les brins supérieurs sont clivés en premier (a), échangés entre les deux partenaires (b), et religés (c). Le point d'embranchement de la jonction de Holliday est positionné au milieu de la région de croisement (6 pb) et les brins supérieurs sont croisés. L'isomérisation de la jonction de Holliday à une configuration de recombinaison dans laquelle les brins inférieurs sont croisés requiert la réorganisation des hélices d'ADN et les quatre demi-sites liés par les sous-unités des recombinases dans le complexe (d). L'isoforme de la jonction de Holliday résultante est résolue en répétant les étapes (a) à (c) en vue d'échanger les brins inférieurs (e). Figure tirée de Hallet et Sherratt 1997 (avec permission).

## **2. La recombinaison site spécifique de type Xer**

### **2.1 Généralités**

Un nombre impair d'événements de recombinaison homologue entre des réplicons circulaires nouvellement répliqués ou en cours de réplification mène à la production des chromosomes dimères ne pouvant pas être ségrégés aux cellules filles au cours de la division cellulaire (Austin et *al.*, 1981 ; Blakely et *al.*, 1991 ; Kuempel et *al.*, 1991). Les dimères plasmidiques peuvent aussi survenir suite à la répllication à cercle roulant durant le transfert conjugal (Warren et Clark, 1980 ; Erickson et Meyer, 1993). Un modèle de la coordination de la résolution des dimères chromosomiques et la division cellulaire a été élaboré pour *Escherichia coli* basé sur une accumulation des données *in vivo* et *in vitro*. Chez *E. coli*, le système de recombinaison site spécifique de type Xer contient un site de recombinaison *dif* de 28 pb et deux recombinases de type tyrosine apparentés, XerC et XerD, ayant une identité de 37% au niveau des acides aminés (Blakely et *al.*, 1993). La recombinaison au site *dif* est dépendante de la division cellulaire et requiert la protéine spécifique au septum, FtsK (Steiner et *al.*, 1999 ; Recchia et *al.*, 1999). Avec la délétion du site *dif* de *E. coli* ou des mutations de *xerC* ou *xerD*, une sous-population des cellules filamenteuses contenant des nucléoïdes partitionnés de façon anormale se développe (Kuempel et *al.*, 1991). Des homologues de XerCD et



de FtsK existent dans la plupart des phylums d'eubactérie et certains lignages des archaeas. Il s'ensuit qu'à partir des expériences faites *in vitro*, des interactions avec le site *dif* de *E. coli* et les recombinases XerCD de *Haemophilus influenza* (Neilson et al., 1999), *Pseudomonas aeruginosa* (Blakely et al., 2000), *Bacillus subtilis* (Schiochetti et al., 2001), *Proteus mirabilis* (Villion et Szatmari, 2003), et *Caulobacter crescentus* (Jouan et Szatmari, 2003) ont été démontrées. Ces observations nous mènent à conclure que la recombinaison Xer est un mécanisme conservé parmi les bactéries à chromosome circulaire.

Malgré le fait que la réaction de recombinaison Xer est catalysée par deux recombinases différentes, les étapes biochimiques semblent être similaires aux autres systèmes de la famille des intégrases  $\lambda$  (Nash 1996 ; Stark et al., 1992). XerC et XerD se lient aux demi-sites gauche et droit, respectivement, du site *dif*, d'une manière coopérative (Blakeley et al., 1993). Chaque protéine clive de façon spécifique un des brins d'ADN. XerC catalyse le premier échange de brins, ainsi formant la jonction de Holliday, qui est éventuellement résolue par XerD afin de générer des produits recombinés (Colloms et al., 1996). *In vivo*, pour ce qui est de la recombinaison chromosomique, XerD fait le premier clivage avant que XerC intervient ; lors de la recombinaison plasmidique, XerC effectue le premier clivage. À part le système *dif*/Xer classique, des études avec *Streptococci* et *Lactococci* (Le Bougeois et al., 2007) indiquent que ces bactéries utilisent une machinerie de recombinaison

Xer différent. Le site *dif* est de 31 pb et il existe une seule recombinase de type tyrosine associée, soit XerS (Le Bougeois et *al.*, 2007). Récemment, après l'analyse de 234 chromosomes de 156 espèces de proteobactéries, Carnoy et Roten (2009) ont trouvé une séquence (*difH*), chez un sous-groupe des  $\epsilon$ -proteobactéries, qui est homologue à *dif*/SL de *Streptococci* et *Lactococci*. Ce sous groupe contient aussi une seule recombinase similaire aux Xer (XerH) (Carnoy et Roten, 2009). Une nouvelle découverte intéressante était faite aussi chez les archaea. Il a été rapporté que les archaea ont un système de recombinaison homologue contenant une seule recombinase XerA, homologue aux protéines XerC/D bactériennes (Cortez et *al.*, 2010).

La recombinaison de type Xer se distingue d'autres systèmes de recombinaison site-spécifique par ses différents résultats et facteurs essentiels, dépendamment s'il agit aux sites de recombinaison naturels des plasmides comme *cer* et *psi* (sur les plasmides ColE1 et pSC101 respectivement) ou sur le site chromosomique *dif*. La recombinaison *in vivo* aux sites *dif* se fait de façon intermoléculaire et intramoléculaire, et ne semble pas avoir besoin d'autres protéines à part les deux recombinases et la protéine FtsK. Cependant, aux sites *cer* et *psi*, la recombinaison est plutôt intramoléculaire et requiert des séquences accessoires d'environ 200 bp ainsi que des protéines accessoires qui aident à l'assemblage d'un complexe synaptique enfermant trois à quatre surenroulements négatifs (Alén et *al.*, 1997).

## 2.2 XerC et XerD

Les recombinaisons XerC et XerD se lient de façon coopérative au site *dif* où elles catalysent la réaction de recombinaison. XerC était identifié grâce à son rôle dans la résolution des multimères chez le plasmide ColE1 en monomères (Summers et Sherratt, 1984). La deuxième recombinaison, XerD était identifié via une homologie de séquence avec XerC et est encodée dans un même opéron avec *recJ* et *dsbC* (Blakely et al., 1993 ; Lovett et Kolodner, 1991 ; Missiakas et al., 1994). La présence de deux recombinaisons dans le système de recombinaison site-spécifique de type Xer assure un alignement adéquat des sites d'action, ce qui élimine l'étape du test après le premier échange (contrairement à Cre) et confère un contrôle du clivage et de l'échange des deux brins (Recchia et Sherratt, 1999 ; Schiochetti et al., 2001). Ces deux recombinaisons, XerC et XerD, font partie de la famille des recombinaisons à tyrosine basé sur la présence de quatre acides aminés conservés requis pour la catalyse : soit la triade Arg-His-Arg suivi par une tyrosine (Esposito et al., 1997 ; Sherratt et Wigley, 1998). Ces quatre résidus se retrouvent dans la partie C-terminale des recombinaisons, qui montrent plus de similitude que les parties N-terminales. Malgré une identité de seulement 37%, XerC et XerD sont les plus analogues parmi les membres assez divergents de la famille des recombinaisons à tyrosine. Il s'ensuit que, chez d'autres eubactéries, des homologues de XerC-XerD sont habituellement identifiés par une homologie

entre eux et aux recombinaisons de *E. coli* (Hayes et al., 1997 ; Neilson et al., 1999 ; Recchia et al., 1999 ; et Schiochetti et al., 1999).

XerC et XerD contiennent deux domaines ; le domaine C-terminale et le domaine N-terminale. Le domaine C-terminale est le plus conservé des deux et contient les résidus catalytiques ainsi que les déterminants pour la liaison spécifique à l'ADN et l'interaction protéine-protéine. Ce domaine permet la formation du complexe synaptique ainsi que le positionnement approprié de la tyrosine catalytique (Spiers et Sherratt, 1999). Le domaine N-terminale contient aussi des déterminants pour l'interaction protéine-protéine et basé sur l'analogie avec Cre, les  $\alpha$ -hélices B et D de ce domaine vont réagir avec le sillon majeur formé par les nucléotides palindromiques intérieures des sites de liaison de la recombinaison (Subramanya et al., 1997). En ce qui concerne l'affinité au site de liaison, XerD démontre une plus forte liaison pour son site que XerC, les deux se liant plus fortement aux sites respectifs en présence de la recombinaison partenaire (Blakely et al., 1993, 1997 ; Spiers et Sherratt, 1999). En effet, la présence du partenaire est obligatoire afin de médier l'échange de leur brin mais l'activité nucléophile n'est pas requise, permettant de déduire l'importance de la structure du complexe de recombinaison (Arciszewska et Sherratt, 1995 ; Arciszewska et al., 1997).

Comme mentionné auparavant, les recombinaisons de type Xer, comme tous les membres des  $\lambda$  intégrases, possèdent la tétrade catalytique en C-terminale. Une poche catalytique est formée par les résidus RHR, qui active le

lien phosphodiester permettant ainsi le clivage de l'ADN par le résidu tyrosine. Ce résidu catalytique est, de plus, caché, ce qui indique une conformation inactive en absence de l'ADN ou du partenaire. En plus de la tétrade RHRY, les recombinaisons possèdent un autre acide aminé conservé, soit le résidu lysine (EcXerD-K172). Ce résidu se retrouve entre les feuillets  $\beta 2$  et  $\beta 3$  dans le motif III et entre en contact avec le substrat, jouant un rôle important dans la réaction de recombinaison. Cette lysine se retrouve aussi chez les topoisomérases eucaryotes de type IB, qui ont aussi la tétrade catalytique RKRY. Ceci laisse prédire que les deux familles dérivent d'une transférase ancestrale commune (Cao et Hayes, 1999 ; Cheng et *al.*, 1998). De plus, il a été démontré que les intégrases ont une activité topoisomérasique de type I qui permet de relaxer les plasmides surenroulés. Chez les recombinaisons XerC et XerD, cette activité de relaxation est inhibée par la présence (même si catalytiquement inactive) de l'autre recombinaison (Cornet et *al.*, 1997).

### **2.2.1 XerC**

#### **Généralités**

Le gène XerC se situe à la 85<sup>ème</sup> minute du chromosome de *Escherichia coli*, près de l'origine de réplication *oriC* et code pour une protéine de 33.8 kDa, ayant une similitude de séquence avec les autres membres de la famille des recombinaisons à tyrosine. XerC fait partie d'une unité multicistronique à quatre gènes ; *dapF* étant le premier gène qui code pour la diaminopimelate épimérase, suivi de *orf235*, *xerc*, et *orf238*. Les fonctions de *orf235* et *orf238*

sont inconnues mais le niveau de traduction de ces derniers est semblable à ceux de *dapF* et *xerC* (Colloms et al., 1990).

La séquence protéique traduite de XerC possède deux régions homologues aux deux domaines conservés de la famille des recombinases site-spécifique de type  $\lambda$  intégrase (Argos et al., 1986). Le domaine 2 de la séquence de XerC contient, parmi d'autres acides aminés moins conservés, trois acides aminés conservés, soit une histidine, une arginine, et une tyrosine. Dans un alignement incluant 160 acides aminés, il a été démontré que XerC a une identité de 32% au niveau des acides aminés avec les protéines FimB et FimE de *E. coli*, qui sont impliquées dans l'inversion d'un segment du chromosome pour changer les antigènes de fimbriae (Klemm 1986). XerC montre aussi une similitude de séquence (66%), dans son domaine 2 conservé, avec une séquence présumée d'une protéine similaire aux intégrases provenant du plasmide R46 (Hall et al., 1987).

### **Fonction**

La protéine XerC se lie à la partie gauche (11pb) des sites de recombinaison chez les plasmides ainsi que chez les chromosomes. Celle-ci assure le premier clivage du brin supérieur et est aussi responsable du premier échange de brins lors de la recombinaison ainsi contribuant à la formation de la jonction de *Holliday*, résolue par XerD (McCulloch et al., 1994). En effet, les mutants de *xerC* donnent un phénotype de filamentation avec des nucleoïdes aberrants qui ne peuvent pas assurer une bonne partition. L'activité catalytique

de XerC seule est suffisante pour médier une paire d'échange de brins, sans l'action catalytique de XerD, suggère que l'activation ainsi que l'attaque nucléophile au lien scissile phosphodiester durant la première réaction de transesterification proviennent de XerC (Arciszewska et Sherratt, 1995). Pour ce qui est de la structure du complexe XerC-ADN, le résidu d'arginine conservé qui se retrouve en position 148 semble être critique. En mutant ce résidu, on constate qu'il y a une altération dans la structure de la jonction de *Holliday*; la nouvelle conformation permet le clivage par XerD tout en inhibant cette action par XerC (Arciszewska et *al.*, 2000).

### **2.2.2 XerD**

#### **Généralités**

XerD est la deuxième recombinase requise pour la recombinaison site-spécifique de type Xer. Situé à la 63<sup>ième</sup> minute du chromosome de *E. coli*, le gène codant pour XerD était connu comme *xprB* auparavant (Blakely et *al.*, 1993). Il fait partie de la même unité transcriptionnelle que *xprA* et *recJ*. La séquence des acides aminés prédite de la protéine XerD démontre une identité de 37% avec XerC. De plus, XerC et XerD partage un haut degré de conservation dans les séquences des domaines I et II, des régions très conservées parmi les membres de la famille de recombinases de type intégrase (Blakely et *al.*, 1993).

### **Fonction**

La protéine XerD se lie au bras droit du site de recombinaison, entraînant une courbure dans l'ADN pour aider à la liaison de XerC à son site respectif (Blakeley et Sherratt, 1996) (Fig.7). Le fait que XerC et XerD contiennent toutes les mêmes résidus conservés peut impliquer la nécessité d'avoir les deux protéines afin de compléter la réaction de recombinaison de type Xer. En effet, des expériences ont démontré que les mutants *xerC* comme *xerD*, empêchent la réaction de recombinaison aux sites *cer* et *dif*. Lorsque ces mutants ont été complétés par le gène fonctionnel respectif porté sur un plasmide, la réaction de recombinaison a été restaurée. Suite aux observations que le gène sauvage de *xerD* pouvait compléter le mutant *xerD* mais pas le mutant *xerC* et que le gène sauvage de *xerC* pouvait compléter le mutant *xerC* mais pas *xerD* (ne restaurant pas la recombinaison normale lorsqu'un des deux gènes était muté), on peut conclure que XerC et XerD sont toutes les deux essentielles pour la recombinaison site-spécifique aux sites *cer* et *dif* (Blakely et al., 1993). XerC et XerD se lie séparément mais de façon coopérative aux sites ; la coopérativité étant une conséquence soit des interactions spécifiques entre XerC et XerD une fois liées aux demi-sites respectifs, soit des changements dans la structure de l'ADN qui se font avec la liaison de l'une ou l'autre des recombinases (Sherratt et al., 1997).



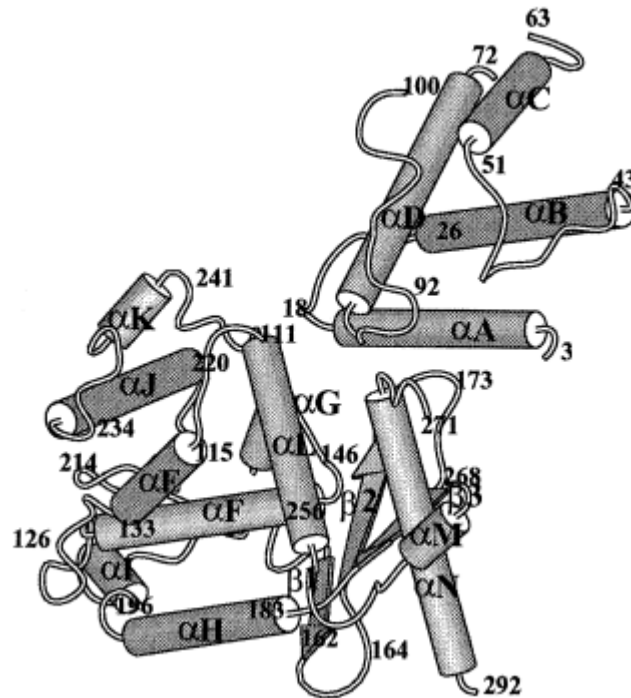
### **2.2.3 Le mécanisme catalytique de XerC et XerD/Structure et Fonction**

Chez *E. coli*, la recombinaison site-spécifique de type Xer requiert la présence de XerC et XerD, chacune faisant l'échange d'une paire de brins d'ADN. Les deux recombinases encodent des fonctions qui sont nécessaires pour la liaison séquence-spécifique à l'ADN, les interactions coopératives entre XerC/XerD, la formation de synapse, et la catalyse. Lors de la réaction de recombinaison, les brins d'ADN sont clivés et joints grâce à la formation d'un intermédiaire covalent protéine-ADN impliquant la tyrosine conservée. XerC et XerD catalysent deux échanges de brins consécutifs, entraînant la formation d'un intermédiaire : la jonction de *Holliday*. Chaque échange de brins réciproque implique un processus en deux étapes dans lequel il y a une attaque de la liaison phosphotyrosyl ADN-protéine au 3' (généralisé par le clivage d'un brin d'ADN à chaque site de recombinaison) par l'extrémité libre 5'OH des sites partenaires. Les brins d'ADN sont échangés en modifiant quelques nucléotides de la région centrale (Nunes-Duby et al., 1995 ; Guo et al., 1999). Ce processus implique que des paires spécifiques de sites actifs sont soit activés ou désactivés dans la tétramère de recombinases afin d'assurer que seulement les brins d'ADN appropriés seront échangés durant les deux étapes de la réaction.

La structure des recombinases nous aide à mieux comprendre comment XerC et XerD interagissent au site de recombinaison afin de compléter la

réaction de recombinaison. La structure de XerD à une résolution de 2,5 Å révèle que la protéine contient deux domaines (Figure 4) (Subramanya et *al.*, 1997). Le domaine I comprend les résidus 1-107 et contient quatre hélices  $\alpha$ , avec deux hélices parallèles à un angle de 90° des deux autres hélices parallèles. Le domaine II comprend les résidus 108-298 et est composé principalement des hélices  $\alpha$  mais contient aussi trois feuillets  $\beta$  antiparallèles. Dans ce domaine on trouve aussi deux motifs de séquences conservés parmi les membres de la famille des intégrases, incluant XerC et XerD ainsi que l'intégrase  $\lambda$  et le intégrase HP1 (Argos et *al.*, 1986 ; Abremski et Hoess, 1992 ; Blakely et Sherratt, 1996b). Le résidu tyrosine du site actif se trouve dans la partie C-terminale du domaine II.

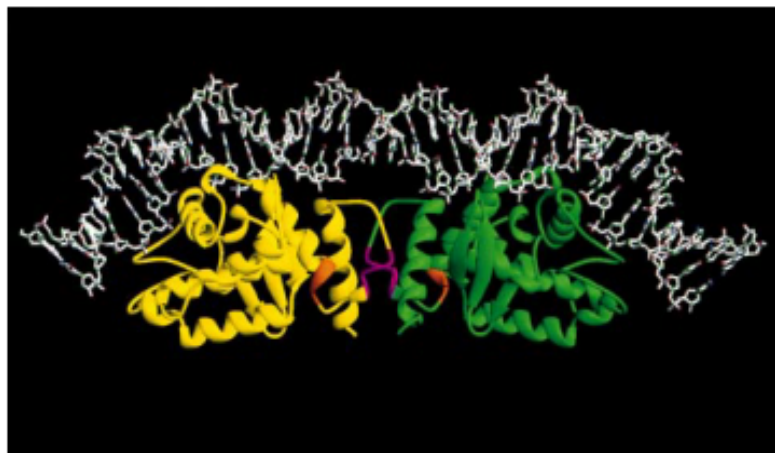
Des études de délétion montrent le domaine I qui possède l'arginine ainsi que la partie-N-terminale de XerD sont important pour la liaison de cette protéine à l'ADN. Cependant, même avec la délétion de certains résidus dans le domaine II importants pour la liaison avec l'ADN, il n'y a pas d'effet sur la capacité de liaison de la protéine. À partir de ces observations, le modèle supportant la présence de deux domaines de liaison à l'ADN interagissant avec deux parties différentes du site par les recombinases est soutenu (Blakely et Sherratt, 1994 ; Spiers et Sherratt, 1997).



**Figure 4.** Structure cristallisée de XerD de *E. coli*. Les chiffres se réfèrent au début et fin des éléments de la structure secondaire. Figure tirée de Subramanya et *al.*, 1997 (avec permission).

Un modèle de la liaison coopérative de XerC et XerD au site *dif* est représenté dans la Figure 5. Quand XerD est tronqué, contenant seulement les résidus 1-268, elle peut toujours lier l'ADN et interagir de façon coopérative avec XerC. Cependant, lorsque XerD contient seulement les résidus 1-262, il n'y a plus de liaison coopérative entre les deux protéines malgré le fait que XerD se lie de façon normale à l'ADN. Une autre région identifiée comme étant importante dans la liaison de XerC et XerD a été trouvée par un mutant de XerD contenant une substitution tripeptidique aux résidus 256-258 (Hallet et *al.*, 1999). Le mutant a la capacité de cliver et d'échanger des brins tout en

permettant l'interaction coopérative avec XerC. Néanmoins, il ne peut pas promouvoir la catalyse par XerC, ce qui identifie une région de XerD important dans l'activation de la catalyse de XerC (Blakely et Sherratt, 1996b).



**Figure 5.** Modèle du complexe entre XerC, XerD, et l'ADN. Représentation des domaines catalytiques des deux recombinases au site *dif*. Les régions des protéines impliquées dans les interactions XerC-XerD sont en orange (résidus 256-258) et magenta (résidus 263-267). Figure tirée de Subramanya et *al.*, 1997 (avec permission).

### **2.3 Le site d'action des recombinases de type Xer**

#### **Généralités**

La recombinaison de type Xer peut avoir lieu soit chez les chromosomes soit chez les plasmides multimeriques. Dans le cas de la recombinaison chromosomique, la réaction se fait au site *dif*, d'abord trouvé chez *E. coli*. Quand la recombinaison a lieu dans les plasmides bactériens, la

réaction se fait aux sites des plasmides comme *cer* chez ColE1 et *psi* chez pSC101. Pour ce qui est du site de recombinaison *cer*, ce dernier est flanqué par des séquences accessoires qui lient des protéines supplémentaires (Blakely et Sherratt, 1996), un phénomène pas trouvé au site *dif*. Les résultats d'un alignement d'au moins 19 plasmides naturels et des chromosomes eubactériens révèlent la présence des homologues du site actif de la recombinaison de type Xer (Tableau 1) (Hayes et al., 1997 ; Lesterlin et al., 2004). Il était aussi montré que les sites actifs des recombinases de la famille des intégrases ont une organisation similaire aux structures des topoisomérases IB des eucaryotes (Grainge et Jayaram, 1999).

En général, les sites de recombinaison sont de 28 à 30 pb, avec deux sites de liaisons des recombinases de 11 pb (système Xer) ou 13 pb (système Cre) ainsi qu'un site central de six à huit pb (site d'échange des brins). Cette région centrale est déterminante pour ce qui est de la nécessité des protéines et séquences accessoires lors de la recombinaison. Aussi, dans une projection cylindrique de l'ADN, la présence d'une région centrale de 6 pb (Cre, Xer) fait en sorte que les liens phosphodiester se superposent presque exactement tandis qu'avec 7 pb (Int) et 8 pb (Flp), les liens sont décalés par 36 et 72° respectivement (Grainge et Jayaram, 1999). En comparant les sites de liaison des recombinases du système Xer, il se trouve que le site de XerD (bras droit) est mieux conservé que celui de XerC (bras gauche) donnant une liaison plus forte de XerD à son site respectif que XerC (Blakely et Sherratt, 1994).

**Tableau I.** Alignement des séquences Xer des plasmides et plusieurs sites *dif* des bactéries différentes (Tableau adapté du mémoire de Hua Liu *The role of Caulobacter crescentus Xer recombinases in site-specific recombination*)

Origine	Site de liaison XerC	Espacement	Site de liaison XerD
<b>Sites plasmidiques</b>			
ColE1 <i>cer</i>	GGTGCGTACAA	TTAAGGGA	TTATGGTAAAT
ColA <i>car</i>	GGTGCGTACAA	--CGGATG	TTATGGTAAAT
CloDF13 <i>parB</i>	GGTACCGATAA	--GGGATG	TTATGGTAAAT
ColK <i>ckr</i>	GGTGCGTACAA	TTAAGGGA	TTATGGTAAAT
NPT16	GGTGCGCGTAA	-TGAGACG	TTATGGTAAAT
pMB1	GGTGCGTACAA	TTAAGGGA	TTATGGTAAAT
pSC101 <i>psi</i>	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
<b>Sites chromosomiques (dif)</b>			
<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>	GGTTTCGCATAA	--TGTATA	TTATGTTAAAT
<i>S. aureus</i>	ACTTCCTATAA	--TATATA	TTATGTATGTT

### **2.3.1 Site de recombinaison chromosomique**

#### **Le site *dif***

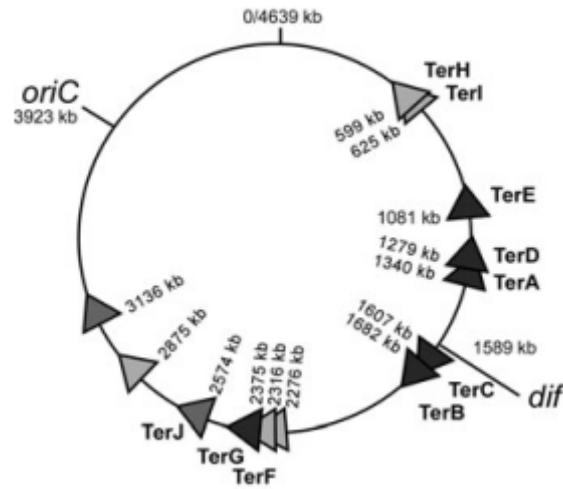
La machinerie de résolution des dimères chromosomiques comprend une ou deux recombinases, XerC et XerD, et leur site de réaction de 28 pb, le site *dif*. Dans une étude récente, Kono et *al.*, ont fait une prédiction des séquences *dif in silico* en utilisant une approche de prédiction phylogénétique basée sur le modèle de Markov. Le modèle a permis l'identification des sites *dif* chez 641 organismes parmi 16 phyla ayant un taux d'identité de 97,64 % pour les souches à chromosome unique. Ceci indique une grande conservation de séquence parmi plusieurs phyla de bactéries. De plus, les positions des séquences de *dif* ont une forte corrélation avec le point de déplacement du skew GC induit par des pressions de mutation/sélection de réplication. Ce fait a mené à postuler que la terminaison de la réplication se fait au site *dif*. Cependant, la différence dans les positions des sites *dif* prédits ne corrèle pas avec le degré de pressions de la réplication (skew GC), suggérant que la terminaison de la réplication n'a pas lieu exclusivement aux sites *dif* (Kono et *al.*, 2011).

#### **2.3.1.1 Site *dif* d'*Escherichia coli***

Le locus *dif* se situe dans la région de la terminaison de la réplication à la minute 33.6 sur la carte génétique d'*E. coli*, entre les sites de l'arrêt de la réplication, *TerA* et *TerC* (Figure 6) et est localisé à l'opposé de l'origine de la réplication *oriC* (Kuempel et *al.*, 1991). Lorsque *dif* est muté, il y a une

filamentation dans environ 15% des cellules causée par un échec dans la résolution des dimères en monomères avant la division cellulaire. Il y a aussi une induction du système SOS et des taux de croissance ralentis par rapport aux souches sauvages (Kuempel et *al.*, 1991 ; Hayes et Sherratt, 1997). Ce phénotype de *dif* est supprimé par l'intégration des plasmides contenant un fragment de 530 pb du locus *dif*, contenant une séquence de 33 pb similaire au site *cer* de ColE1 promouvant la recombinaison (Kuempel et *al.*, 1991 ; Blakely et *al.*, 1991). Cependant, pour supprimer le phénotype de façon efficace, l'intégration de la séquence de 33pb doit se faire à la position normale du site *dif* (Tecklenburg et *al.*, 1995). L'activité du site *dif* dans la résolution des dimères chromosomiques dépend sur son placement dans une section définie de la région de terminaison de la réplication (Cornet et *al.*, 1996 ; Kuempel et *al.*, 1996 ; Leslie et Sherratt, 1995 ; Tecklenburg et *al.*, 1995).





**Figure 6.** Positions de sites Ter chez *E. coli*. Positions du génome correspond à la séquence de *E. coli* K12. Les sites Ter sont représentés par des triangles ; les triangles foncés indiquent que le sites correspondent au consensus, les triangles moyennement foncés et les triangles plus claires indiquent soit un ou deux « mismatches » respectivement. Figure tirée de Hendrickson et Lawrence, 2007 (avec permission).

Plus spécifiquement, *dif* soit être insérer dans la région autour de sa position naturelle, soit une région de 15-20 kb, la zone DAZ (*dif* activity zone). Cette zone est l'endroit où a lieu la recombinaison spécifique entre les sites *dif* dans les cellules pouvant former les chromosomes dimériques (Pérals et al., 2000 ; 2001). Chez le chromosome de *E. coli*, il y a de courtes séquences polarisées RRNAGGGS se trouvant sur le brin avancé, de *oriC* jusqu'à *dif* (Salzberg et al., 1998 ; Capiaux et al., 2001). À 400 kb près de *dif* les segments polaires sont à 90% trouvés sur le brin avancé jusqu'à DAZ. Cependant, dans la région DAZ, cette polarisation n'existe pas (Cornet et al., 1996 ; Kuempel et al., 1996 ; Pérals et al., 2000). Pérals et al., ont démontré que *dif* peut être

inséré n'importe où dans les 150 kb qui flanquent sa position normale à moins que les séquences polarisées convergent vers le nouveau *dif* (Pérala et al., 2000). Donc, DAZ est créée par des séquences polaires. Ceci est supporté par le fait que les chromosomes ayant des délétions de 150 kb autour de *dif* contiennent toujours un DAZ. Les délétions donnent naissance à un nouveau DAZ au positionnement qui juxtapose les séquences d'ADN à gauche et à droite de *dif* sur une carte linéaire de la région du terminus (Pérala et al., 2000).

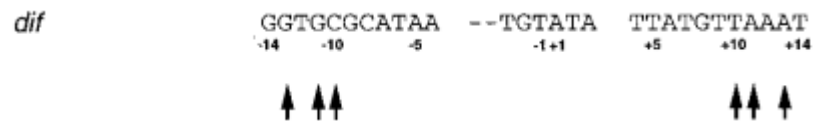
Bien que le positionnement du site *dif* soit crucial pour le fonctionnement de la recombinaison, étant donné l'importance des séquences appelées KOPS pour le bon chargement et translocation de la protéine FtsK pointant cette dernière vers les sites *dif* et ainsi assurant que FtsK amène les sites *dif* ensemble, la séquence n'a pas autant d'importance. En remplaçant *dif* à son positionnement naturel par *psi* de pSC101 ou *loxP* du bactériophage P1, la recombinaison se déroule sans la génération du phénotype Dif (Cornet et al., 1994 ; Leslie et Sherratt, 1995).

#### **2.3.1.1.1 Structure**

La taille minimum du site *dif* pour la monomérisation des chromosomes dimériques est de 28 pb (Leslie et Sherratt, 1995 ; Tecklenburg et al., 1995), dans lequel il y a deux sites de liaison de 11 pb, où XerC et XerD se lient, séparés par une région centrale de 6 pb (8 pb pour le site *cer*). Le site *dif* ne requiert ni des séquences ni des protéines accessoires, ce qui diffère des sites

plasmidiques et élimine la sélectivité de résolution (Blakely et *al.*, 1991). Ce site peut aussi être remplacé par le site *psi* de pSC101 (Cornet et *al.*, 1994) ou *loxP* du phage P1 (Leslie et Sherratt, 1995), qui tous les deux recombinaison de façon intermoléculaire tant que intramoléculaire comme le site *dif*. Les sites de liaison des deux recombinases sont des palindromes partiels ; cependant, les deux demi-sites sont reconnus spécifiquement par XerC ou XerD (Blakely et *al.*, 1993). Il se trouve que les sites de liaison de XerD sont bien conservés tandis que les sites de liaison de XerC sont plutôt variables (Tableau 1 ; Sherratt et *al.*, 1993). Aussi, XerC se lie plus faiblement à son site respectif que XerD, ce qui est compensé par des fortes interactions coopératives entre les deux protéines (Blakely et *al.*, 1993). Puisque six des 11 positions sont palindromiques en ce qui concerne le site *dif*, les déterminants qui spécifient la liaison soit de XerC ou XerD se retrouvent dans les cinq positions restantes. Trois de ces nucléotides ne sont même jamais palindromiques au site de liaison de XerC, soit dans les positions -13, -11, et -10 correspondant aux nucléotides dans le site de XerD, soit +13, +11, et +10 (Hayes et Sherratt, 1997) (Fig.7). Suite à des expériences, il semble que le nucléotide -10C soit le plus important pour la liaison spécifique de XerC puisqu'en le mutant, on assiste à une abolition de l'activité de liaison de la protéine *in vitro*. Pour ce qui est de XerD, le déterminant de la liaison spécifique se retrouve dans le nucléotide +9T mais aussi dans le nucléotide +13A (Hayes et Sherratt, 1997). Les extrémités de la région centrale et les sites de liaison des recombinases sont pensés contenir les

bases impliquées dans le clivage ainsi que l'échange des brins (Summers 1989) selon la symétrie des demi-sites et par la correspondance avec les emplacements des sites de clivage d'autres recombinases. (Hoess et *al.*, 1986 ; Bruckner et Cox, 1986).



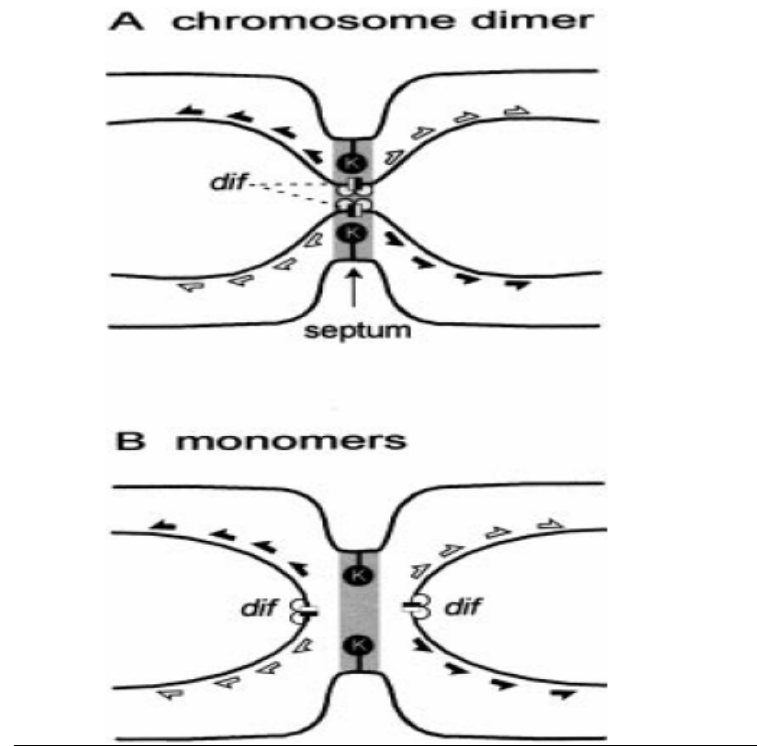
**Figure 7 :** Séquence *dif* *E. coli*. Les flèches noires représentent des positionnements qui ne sont jamais symétriques entre le site de liaison de XerC et le site de liaison de XerD. Figure tirée de Hayes et Sherratt, 1997 (avec permission).

#### 2.2.1.1.2 Lien : recombinaison, division cellulaire et structure chromosomique

La recombinaison de type Xer est sujette à plusieurs niveaux de contrôle différents qui interagissent ensemble, incluant l'emplacement du site *dif*, la recombinaison homologue et la présence de la protéine de division localisée au septum : FtsK. D'abord, la structure du chromosome joue un rôle crucial dans la résolution des chromosomes dimères en activant le positionnement des sites *dif* dans les environs du septum de division. Des données montrent aussi que la recombinaison *dif* se fait préférentiellement entre des sites sur un chromosome dimérique (Steiner et Kuempel, 1998a ; Pérals et *al.*, 2001). Cette limitation de la recombinaison a sa base dans

l'observation que l'activation spécifique de DAZ est supprimée dans les souches *recA<sup>-</sup>*, suggérant que l'induction DAZ-spécifique s'effectue seulement chez les dimères chromosomiques. Ceci restreint la recombinaison *dif* aux dimères, tout en empêchant la recombinaison entre des monomères. Pris ensemble, ces conclusions suggèrent qu'entre des chromosomes monomériques et dimeriques, la région *dif* montre une structure et/ou un emplacement intracellulaire différent permettant la formation du complexe XerCD-FtsK-*dif* exclusivement quand les chromosomes sont en dimères. De plus, les protomères de FtsK sont associées au septum chez les cellules sauvages, ainsi limitant la recombinaison *dif* au septum de division. Toutes ces conclusions ne font que renforcer le modèle de « co-location » qui postule qu'un mécanisme de mobilisation, agissant sur des éléments de séquences polaires trouvés dans des orientations inversées sur chaque coté de *dif*, conduit l'ADN chromosomal hors du plan de division avant la division cellulaire (Figure 8) (Pérals et al., 2001). Dans le cas d'un dimère, le processus de mobilisation agit dans le but de positionner les deux DAZ et les sites *dif* en proximité avec le septum de division, permettant ainsi la résolution du dimère suite à la formation du complexe XerCD-FtsK-*dif*. D'autres cycles de recombinaison *dif* sont évités en effectuant la résolution des dimères en deux chromosomes monomériques. C'est quand les chromosomes sont en monomères que les régions *dif* sont enlevés du septum avant que la recombinaison de *dif* a lieu. De cette façon, les

sites *dif* peuvent se localiser au septum seulement quand les chromosomes sont en dimères (Pérals et *al.*, 2001).



**Figure 8.** Modèle de « co-localisation ». Les dessins représentent la partie centrale d'une cellule en division durant la constriction du septum. Les cercles représentent les protéines : C, XerC ; D, XerD ; K, FtsK. Les lignes avec les flèches représentent la partie terminale du chromosome avec *dif* (carré noir et blanc). Les flèches noires représentent quelques éléments d'organisation orientés du chromosome impliqués dans la formation de DAZ au point de convergence. (A) Dans le cas des chromosomes dimères, la région *dif* peut rester prise dans le septum et l'interaction du complexe XerCD+/- *dif* avec FtsK résulte dans l'activation de la recombinaison *dif* et permet la résolution des chromosomes dimères (CDR). La région grise représente la partie de la cellule dans laquelle les sites *dif* doit se retrouver pour accéder aux facteurs d'activation associés au septum. (B) Si les chromosomes sont des monomères ou quand la résolution a lieu d'un chromosome dimère, la structure et ségrégation chromosomique peuvent prévenir les sites *dif* d'accéder au septum qui se ferme et donc aux facteurs d'activation. Figure tirée de Pérals et *al.*, 2001 (avec permission).

## 2.4 Facteurs accessoires

Lors de la recombinaison, les facteurs accessoires sont nécessaires afin d'aider dans la résolution des multimères en promouvant des changements dans la conformation de l'ADN. Au site chromosomique *dif*, la protéine de division cellulaire, FtsK, rentre en jeu lors de la recombinaison. Pour ce qui est du plasmide ColE1, ce sont plutôt les protéines ArgR et PepA qui interagissent avec le site *cer*. ArgR, répresseur de la biosynthèse de l'arginine (Stirling et al., 1988), se lie à la boîte ARG, située à 100 pb à gauche du site *cer*, afin d'entraîner une torsion dans la double hélice pour rapprocher les deux sites de recombinaison directement répétés sur la même molécule (Tian et al., 1992). PepA est l'aminopeptidase A qui se lie à l'ADN en hexamère lors de la recombinaison et aide dans la stabilisation de structure du complexe nucléoprotéique (Alén et al., 1997 ; Sträter et al., 1999). En fait, ArgR est pris entre deux hexamères de PepA lors de la réaction de recombinaison donnant la conformation suivante : PepA-ArgR-PepA-tour de 60 pb-PepA-XerC-XerD (Sträter et al., 1999).

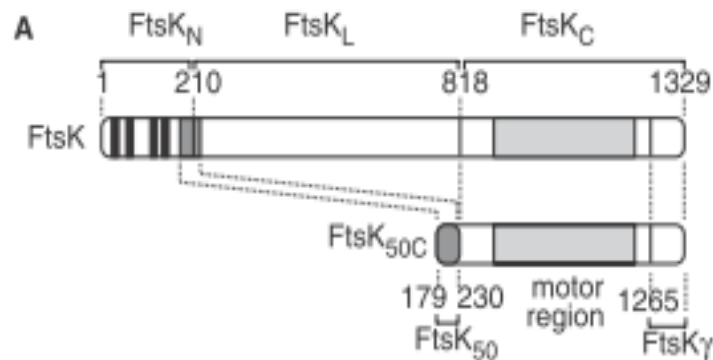
### 2.4.1 FtsK

Le succès de la ségrégation des bactéries à chromosome circulaire dépend de la résolution des chromosomes dimériques en monomères. Ceci requiert l'action des recombinases XerC/D au site *dif* dans la région de terminaison du chromosome. La réaction de recombinaison requiert aussi la

protéine FtsK, une translocase d'ADN, qui assure la coordination de la ségrégation chromosomale avec la division cellulaire (Yates et *al.*, 2006). FtsK est une protéine à plusieurs domaines avec des rôles dans la decaténation et ségrégation des chromosomes, la résolution des dimères, et la division cellulaire (Liu et *al.*, 1998 ; Capioux et *al.*, 2001 ; Ip et *al.*, 2003). Plus spécifiquement, elle fait partie de la famille des translocases FtsK/SpoIIIE qui participent dans les phases tardives de la ségrégation des chromosomes. FtsK est fait de 1329 résidus d'aa repartis dans trois domaines (révisé dans Bigot et *al.*, 2007) ; N-terminale (FtsK<sub>N</sub>), fait de 200 aa, C-terminale (FtsK<sub>C</sub>), fait de 500 aa, et le domaine « linker » (FtsK<sub>L</sub>) fait de 600 aa qui relie les domaines C-terminale et N-terminales (Dubarry et *al.*, 2010) (Figure 9). Le domaine N-terminale sert à ancrer la protéine au septum, fonctionne dans la cytokinesis (Draper et *al.*, 1998) et est essentiel dans la division cellulaire (Dubarry et *al.*, 2010). Le domaine C-terminale de sa part fonctionne comme une translocase d'ADN à trois sous-domaines ;  $\alpha$  et  $\beta$  forment le moteur tandis que le sous-domaine  $\gamma$  est le domaine régulatrice qui lie l'ADN en vue de réagir avec XerCD (Barre et *al.*, 2000 ; Massey et *al.*, 2006 ; Sivanathan et *al.*, 2006 ; Yates et *al.*, 2006). Le domaine  $\gamma$  interagit directement avec la machinerie de recombinaison afin d'activer la résolution des dimères, plus spécifiquement avec XerD pour l'activation de la réaction (Massey et *al.*, 2006). Très récemment, il a été démontré que le domaine « linker » a une implication dans la septation normale, tels que la stabilisation des protéines de division cellulaire



au site de septation (Dubarry et *al.*, 2010). Concernant la structure des domaines de FtsK, cette dernière est similaire pour toutes les protéines de FtsK identifiées ; cependant le domaine « *linker* » varie de façon significative dans sa composition et longueur parmi les espèces bactériennes malgré le fait qu'il est essentiel pour la recombinaison normale au site *dif* et la division cellulaire chez *E. coli* (Boyle et *al.*, 2000 ; Bigot et *al.*, 2004). Les protéines similaires à FtsK sont hautement conservées chez les eubactéries et semblent avoir le même fonctionnement que FtsK de *E. coli* (Biller et *al.*, 2009 ; Iyer et *al.*, 2004 ; Wu et *al.*, 1995).



**Figure 9.** Schéma de FtsK de *E. coli*. Les emplacements des résidus d'acide aminés délimitant les différents domaines de la protéine sont indiqués. Les barreaux noirs représentent les domaines transmembranaires. Figure tirée de Bonné et *al.*, 2009 (avec permission).

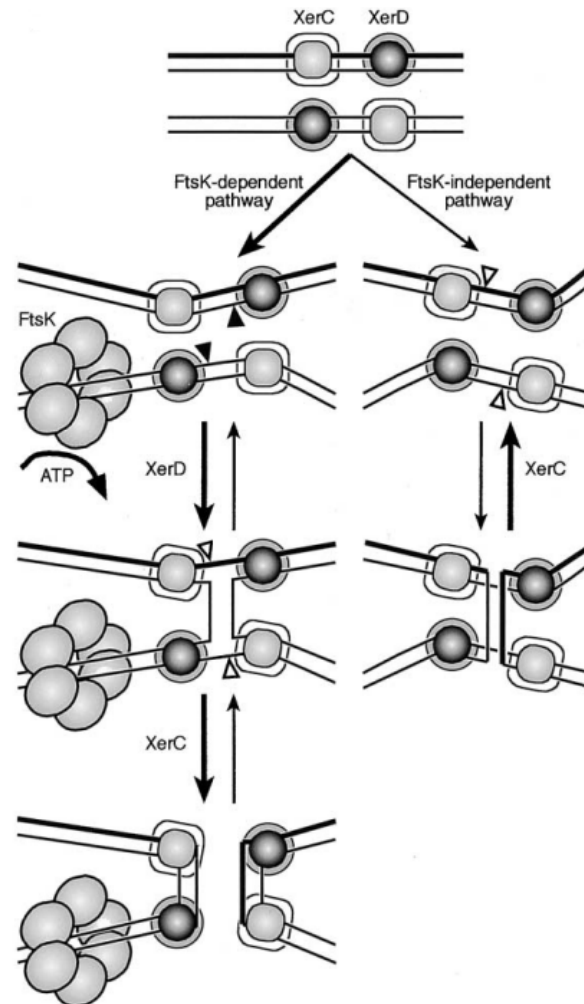
Le domaine N-terminale de FtsK contient quatre hélices transmembranaires (Dorazi et Dewar, 2000) et est ciblé au septum de division

par FtsZ, ZipA, et FtsA (Wang et Lutkenhaus, 1998 ; Yu et *al.*, 1998 ; Pichoff et Lutkenhaus, 2002) où il aide au recrutement d'autres protéines de division cellulaire (Chen et Beckwith, 2001). En absence de ce domaine, il y a formation des filaments lisses et aseptates puis éventuellement la mort cellulaire (Diez et *al.*, 1997 ; Draper et *al.*, 1998). Contrairement à FtsK<sub>C</sub> qui forme des multimeres, la structure tertiaire formée par FtsK<sub>N</sub> n'est pas connue. Il est plausible de penser que ce domaine requiert d'autres protéines de division ou la fermeture même du septum afin de faire une oligomérisation, ce qui peut restreindre la formation des multimeres de FtsK<sub>C</sub> actifs jusqu'à la fermeture du septum ; ceci peut aider à établir un contrôle temporel de l'activité de FtsK (Bigot et *al.*, 2004).

Le domaine C-terminale joue des rôles dans la translocation de l'ADN ainsi que dans la recombinaison de type Xer. Dans des expériences *in vitro*, où FtsK est tronqué, laissant seulement la partie C-terminale intacte, la recombinaison XerC/D se déroule sans faute jusqu'à complétion (Aussel et *al.*, 2002). Ceci appuie son rôle clé dans l'activation de la réaction de la recombinaison. L'activation se fait à proximité du complexe nucléoprotéique et requiert l'hydrolyse de l'ATP ; elle dépend aussi des interactions spécifiques aux espèces entre le C-terminale et XerCD-*dif*. La partie C-terminale de FtsK fonctionne aussi comme une translocase dépendante de l'ATP (Aussel et *al.*, 2002) faisant la translocation de l'ADN double brin dirigée, a une vitesse d'environ 5 kb/seconde, tout en enlevant les barrages de protéines ou acides

nucléiques lors sa translocation (Aussel et *al.*, 2002 ; Graham et *al.*, 2010a ; Graham et *al.*, 2010b ; Lowe et *al.*, 2008 ; Pease et *al.*, 2005 ; Saleh et *al.*, 2004 ; Sivanathan et *al.*, 2006 ; Sivanathan et *al.*, 2009). En tant que tel, elle induit des boucles dans l'ADN. En fait, pendant la présence de l'ADN, le plie ATPase de FtsK<sub>C</sub> s'assemble dans des structures hexamériques qui encerclent l'ADN à double hélice (Massey et *al.*, 2006). Ce sont ces structures hexamériques qui convertissent l'énergie relâchée de l'hydrolyse de l'ATP pour permettre la protéine d'assurer la translocation de l'ADN (Selah et *al.*, 2004 ; Pease et *al.*, 2005). L'activité de bouclage de l'ADN, qui se fait indépendamment des protéines Xer (Saleh et *al.*, 2004), facilite la formation des synapses Xer de recombinaison qui donne des produits monomériques, appuyant le rôle proposé de FtsK *in vivo* dans le rapprochement des sites *dif* chez les chromosomes dimères (Aussel et *al.*, 2002 ; Ip et *al.*, 2003). Les sous-domaines  $\alpha$  et  $\beta$  du FtsK<sub>C</sub> dénotant la partie « moteur » de la protéine, le sous-domaine  $\gamma$  est clé dans l'activation de la recombinaison. Ce sous-domaine agit directement avec la machinerie de recombinaison, plus spécifiquement avec la recombinase XerD (Yates et *al.*, 2006). En induisant l'activité catalytique de XerD, le sous-domaine  $\gamma$  promeuve la génération de l'intermédiaire de la jonction de *Holliday* ensuite résolu par XerC (Grainge et *al.*, 2011). Sans la partie C-terminale de FtsK, le complexe XerCD-*dif* peut adopter une conformation permettant le premier échange de brins par XerC, mais la jonction de *Holliday* se reconvertit en substrat par une deuxième catalyse de la

part de XerC (Aussel et *al.*, 2002 ; Barre et *al.*, 2000). Avec cette partie de FtsK, le complexe nucléoprotéique possède une conformation qui permet le premier échange de brins par XerD, donnant une jonction de *Holliday* résolue par XerC (Aussel et *al.*, 2002) (Figure 10). Le changement dans les propriétés catalytiques du complexe dépend d'un contact direct du sous-domaine  $\gamma$  avec XerD (Yates et *al.*, 2003 ; 2006). Des nucléotides dans les environs de *dif* ont été identifiés qui sont impliquées dans la stabilisation de FtsK à proximité du complexe XerCD-*dif*, permettant un contact suffisamment long et stable entre FtsK $\gamma$  et XerD pour que la recombinaison ait lieu (Bonne et *al.*, 2009).



**Figure 10.** Voies de Recombinaison au site *dif* de type Xer dépendantes et indépendantes de FtsK. En absence de FtsK, le complexe synaptique de Xer adopte une conformation convenable pour l'échange de brins médié par XerC. FtsK peut utiliser l'énergie de l'ATP pour changer le complexe synaptique de Xer à une conformation convenable pour l'échange de brins par XerD. Les sites de clivage de XerC et XerD sont indiqués par des triangles blancs et noirs respectivement. Figure tirée de Aussel *et al.*, 2002 (avec permission).

Chez *E. coli*, il existe des sites de chargement préférentiels pour FtsK<sub>C</sub> qui sont des séquences de 8 pb 5'-GGGNAGGG-3', appelés KOPS (FtsK<sub>C</sub>

orientating polar sequences) (Bigot et *al.*, 2005 ; Levy et *al.*, 2005 ; Bigot et *al.*, 2006 ; Sivanathan et *al.*, 2006). Les KOPS interagissent avec les résidus aux extrémités du C-terminale, soit le domaine d'hélice ailé du sous-domaine  $\gamma$  (Sivanathan et *al.*, 2006 ; Löwe et *al.*, 2008), et promeuvent le chargement de FtsK hexamérique dans une orientation précise dictant le sens de translocation (Bigot et *al.*, 2006). Sivanathan et *al.*, 2006 ont démontré que le sous-domaine  $\gamma$  agit aussi comme un régulateur négatif de l'activité de translocation de FtsKc lorsque affronter par un KOPS dans une orientation non-permissive. Sur les deux replichores du chromosome, les KOPS sont biaisés et pointent vers les sites *dif* (Bigot et *al.*, 2005 ; Levy et *al.*, 2005). L'hexamère de FtsK est donc assemblé sur un côté de KOPS et le biais de ces séquences garantit que la translocation de FtsK amène ensemble les sites *dif* sur le chromosome dimère. La synapse des sites *dif* mène à l'activation de la recombinaison par une interaction du sous-domaine  $\gamma$  de FtsK<sub>C</sub> avec la recombinase XerD (Yates et *al.*, 2003 ; Yates et *al.*, 2006).

FtsK est ciblé au septum invaginant au moment de la complétion de la réplication de l'ADN et a probablement accès à l'ADN chromosomal qui n'a pas été ségrégué dans le temps nécessaire (Bigot et *al.*, 2004 ; Grainge et *al.*, 2007 ; Kennedy et *al.*, 2008). FtsK, comme plusieurs hélicases et translocases, enlève des protéines de l'ADN lors de la translocation afin d'assurer sa fonction (Lusser et Kadonaga, 2003 ; Lohman et *al.*, 2008). Cependant, FtsK arrête sa translocation une fois qu'elle rencontre XerCD-*dif* d'un des deux

cotés, consistent avec son rôle biologique dans l'activation de la recombinaison de XerCD-*dif* (Graham et *al.*, 2010b). Malgré le fait qu'il ya une baisse dans l'activité du moteur de FtsK une fois qu'elle rencontre le complexe ADN-recombinase, FtsK ne se dissocie pas. L'arrêt de FtsK au complexe est essentiel pour l'activation de la décaténation des chromosomes et aide à minimiser les collisions avec des fourches de réplication convergentes au *dif*, ce qui peut mener à une réversion des fourches de réplication, de la recombinaison homologue non-voulue, ou des brisures de l'ADN double brin (Graham et *al.*, 2010b).

## **2.5 Régulation de la Recombinaison de type Xer**

La recombinaison de *dif* se fait seulement sur des chromosomes dimères ; pour que la recombinaison soit efficace pour la résolution des dimères, le site *dif* doit être localisé dans une région autour de son positionnement naturel, soit le DAZ (Cornet et *al.*, 1996 ; Kuempel et *al.*, 1996 ; Pérals et *al.*, 2000 ; Tecklenburg et *al.*, 1995). Le DAZ est le site de recombinaison spécifique entre des sites *dif* seulement chez les cellules pouvant former des chromosomes dimériques (Pérals et *al.*, 2000 ; 2001). Il s'ensuit que la formation d'un complexe active de recombinaison (XerCD-*dif*-FtsK) est probablement restreinte aux cellules ayant un chromosome dimère (Lesterlin et *al.*, 2004). Alors que les chercheurs essayaient de trouver les déterminants du positionnement DAZ, ils ont pu mettre en évidence le

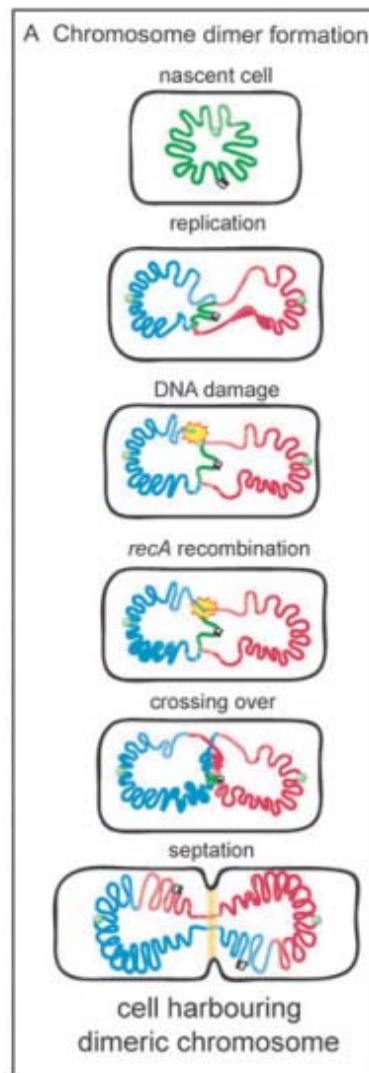
phénomène de polarisation du chromosome. Plus spécifiquement, les séquences entourant *dif* semblent être polarisées intrinsèquement sur l'axe de *oriC-dif*. L'orientation relative de ces séquences déterminent le positionnement de DAZ ; cependant le mécanisme de reconnaissance de cette polarisation et son utilité sont inconnus. Lesterlin et *al.*, (2004) propose que FtsK pourrait représenter un bon candidat pour le positionnement des sites *dif* avant la recombinaison ainsi que la reconnaissance de la polarisation. Comme mentionné auparavant, FtsK active XerD pour la catalyse de la recombinaison de type Xer et elle fait la synapse des sites *dif* des chromosomes dimères (Capiaux et *al.*, 2002 ; Corre et Louarn, 2002 ; Aussel et *al.*, 2002 ; Yates et *al.*, 2003). L'activité de translocase de FtsK la rend efficace pour le positionnement des sites *dif* avant la recombinaison et de cet effet, FtsK associée au septum se mettrait sur les chromosomes pour mobiliser l'ADN selon son polarisation. Il y aura un arrêt une fois le complexe XerCD-*dif* rencontré, ainsi assurant la bonne répartition de l'ADN dans les chromosomes sœurs et la synapse des sites *dif*. Ensuite, un contact physique entre FtsK et le complexe nucléoprotéique permet la résolution des dimères. En présence d'un dimère, les complexes XerCD-*dif* et FtsK co-localisent au septum de division au moment de la septation ; ceci restreint la recombinaison au région du septum (Lesterlin et *al.*, 2004).

### **2.5.1 Contrôle de la Recombinaison Homologue**

Chez *E. coli*, des expériences ont montré que 10-15% des cellules ont besoin de la recombinaison de type Xer afin de résoudre les chromosomes



dimères (Cornet et *al.*, 1996 ; Steiner et Kuempel, 1998a ; Pérals et *al.*, 2000). La grande majorité de ces dimères sont formés suite à la recombinaison homologue (Steiner et Kuempel, 1998a ; Pérals et *al.*, 2000). La recombinaison homologue peut être requise pour la complétion de la réplication ; des fourches de réplication qui s'arrêtent à une lésion dans l'ADN peuvent créer des extrémités d'ADN ayant besoin de la recombinaison pour le recommencement de la réplication (Kuzminov, 1999) (Figure 11). Le processus de la recombinaison peut faire une des deux choses suivantes : échanger des séquences flanquant (Sister Chromatid Exchange) ainsi formant des dimères, ou pas, laissant des chromosomes monomériques. Il s'ensuit que le taux de formation des dimères dépend de la fréquence de la recombinaison entre des chromosomes sœurs et la fréquence à laquelle des événements de recombinaison mènent à l'échange des chromatides sœurs (Lesterlin et *al.*, 2004).



**Figure 11.** Les chromosomes dimères et le cycle cellulaire. Le dessin représente une cellule de *E. coli* avec les chromosomes en rouge et bleu. Le cercle vert représente *oriC* et les carrés noirs et blancs représentent les sites *dif*. Formation d'un dimère durant la réplication. L'éclair jaune représente la réparation de la recombinaison d'une brisure double brin menant à un « crossing over ». Ceci crée un dimère qui persiste jusqu'à l'initiation de la septation (zone d'orange pale). Figure tirée de Lesterlin et *al.*, 2004 (avec permission).

Les chromosomes dimériques sont la conséquence d'un échange de chromatides sœurs (Sister Chromatid Exchange). Une recombinaison réciproque entre des chromosomes filles va produire des dimères. Aussi, une cassure à ou près d'une fourche de réplication suivi de l'invasion par un cercle intact d'ADN par une extrémité double brin peut donner des chromosomes dimériques (Kuzminov, 1995). En fait, chez *E. coli*, il y a deux grandes voies de recombinaison RecA-dépendantes : (1) la voie RecBC- dépendante et (2) la voie RecF-dépendante. La première commence avec le traitement des brisures double brins par le complexe RecBCD, tandis que la deuxième commence à partir des espaces simple brins et dépend de RecFOR (Cox et *al.*, 2000). Les deux produisent une jonction de *Holliday* qui est normalement résolue par le complexe RuvABC (peut aussi être résolue via d'autres processus sans Ruv) (Van Gool et *al.*, 1999 ; Cromie et Leach, 2000 ; Michel et *al.*, 2000).

### 3. *Staphylococcus aureus*

*Staphylococcus aureus* est une bactérie à Gram positif, de type anaérobie facultative. Elle se présente comme un coque en amas et représente la cause la plus fréquente des infections associées au staph (Klutymans et *al.*, 1997). *S. aureus* est l'espèce la plus pathogène de son genre et est impliquée dans plusieurs maladies touchantes l'humain telles que les infections cutanées, la pneumonie, la méningite, les gastroentérites, et le syndrome du choc toxique pour en nommer quelques unes. Elle est toujours une des grandes causes des infections nosocomiales et d'une grande soucie sont les souches devenues

résistantes aux antibiotiques, notamment le SARM (MRSA : methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*). De plus, avec la pression des antibiotiques exercée par l'utilisation croissante de la vancomycine pour traiter des infections de SARM, des souches résistantes à la vancomycine commencent à apparaître (David et Daum, 2010). Il existe alors une grande urgence de trouver une cible efficace pour combattre cette bactérie.

Dans des analyses préliminaires phylogéniques, toutes les protéines connues comme ou pouvant être des orthologues de XerC/D de *E. coli* se regroupent ensemble dans une même branche, distinctes des intégrases des bactériophages ou des transposases. La recherche des homologues dans une banque de données révèle la présence de deux protéines chez *S. aureus* trouvées dans la branche des XerC/D. Tandis que la protéine XerD de *S. aureus* se regroupe de façon significative avec les séquences de XerD des protobactéries- $\gamma$ , XerC de *S. aureus* ne se regroupe pas de la même façon avec les séquences de XerC des protobactéries. Cependant, la présence d'un arginine conservé dans l'hélice de reconnaissance de l'ADN (Subramanya et al., 1997) de cette dernière démontre que XerC de *S. aureus* représente un orthologue du XerC protobactérienne (Chalker et al., 2000)

Des mutations au niveau des gènes *xerC* et *xerD* chez *Staphylococcus aureus* par « allelic replacement » a permis de mieux comprendre le rôle de ces gènes chez cette bactérie. Les mutations étaient effectuées en amplifiant 500 pb en amont et en aval des gènes *xerC* et *xerD* de l'ADN chromosomal de

la souche *S.aureus* WCUH29 en utilisant la technique de PCR. Par la suite, ces derniers étés clonés dans un vecteur, soit le pBluescriptTet, flanquant un gène de résistance à l'érythromycine exprimé de façon constitutive pour la création des mutants pCod1 (mutant *xerC*) et pRip2 (mutant *xerD*). Pour ce qui est de XerC, les cellules mutantes de *xerC* montrent une augmentation significative au niveau de la taille par rapport aux cellules sauvages et ont une phase stationnaire plus lente. Ce rétablissement lent a partir de la phase stationnaire et la taille augmentée des mutants coïncident avec le phénotype de ségrégation déficient des mutants *xerC*, *xerD*, et *dif* de *E. coli*. De plus, dans un modèle d'infection, le mutant *xerC* est atténué de façon significative, suggérant que même un petit empêchement dans l'efficacité de ségrégation d'une cellule peut être délétère au bon établissement de l'infection. Les résultats de la mutation de *xerD* étaient assez surprenants. En fait, chez *S. aureus*, Chalker et al., (2000) ne pouvaient pas obtenir un mutant *xerD* par mutagénèse. Toutes les cellules présumées mutantes de *xerD* avaient une copie de *xerD* sauvage ainsi qu'un locus muté ; ceci suggèrait que seulement les mutants *xerD* contenant un deuxième gène fonctionnel étaient viables. Ils ont conclu que ce locus était essentiel pour la viabilité et ce représentait le premier exemple d'un membre essentiel de la famille des intégrases  $\lambda$ . Suite a ces découvertes, Chalker et al., (2000) suggèrent que le produit de ce gène contient une fonction séparé, en plus de/à la place de sa fonction dans la résolution des chromosomes. La découverte de nouvelles cibles de *S. aureus* s'avère très importantes, surtout

avec les nombreuses résistances aux antibiotiques de cette bactérie ; les résultats de Chalker et *al.*, (2000) démontre XerD comme cible potentielle pour un nouvel inhibiteur anti-*S.aureus*. De plus, le comportement des mutants *xerC* démontre que en ciblant d'autres membres de la famille des intégrases  $\lambda$ , le spectre d'un tel agent peut s'étendre en causant une variété des effets spécifiques aux espèces sur la virulence (Chalker et *al.*, 2000).

La recombinaison site-spécifique peut aussi agir aux niveaux des plasmides chez *S. aureus*, aidant dans la stabilité globale de ce derniers ainsi que dans la résolution des plasmides multimeriques (Hakkaart et *al.*, 1984 ; Summers et Sherratt, 1984). La plupart de petits plasmides chez cette bactérie contiennent un ou deux sites de recombinaison, soit  $RS_a$  et  $RS_b$  (Novick et *al.*, 1981). Il a été rapporté que la recombinaison  $RS_b$  se fait par une fonction de recombinaison phagique site-spécifique car les cointégrats de  $RS_b$  ont été obtenu après la cotransduction, avec les « *crossover* » se faisant à une séquence conservée de 18 pb. Ce n'était pas le cas pour la recombinaison  $RS_a$ , indiquant ainsi un mécanisme non-conventionnel qui reconnaît une région courte et spécifique mais avec la catalyse de l'échange de brins ayant lieu à des sites différents dans cette région. Ceci a permis à Gennaro et *al.*, (1987) d'identifier une protéine de recombinaison encodée par un plasmide, soit *Pre*, qui fait la recombinaison à  $RS_a$ . Cependant, malgré le fait que la protéine *Pre* soit nécessaire à la recombinaison aux site de  $RS_a$ , une fonction de hôte *rec* pourrait jouer aussi un rôle en donnant une certaine efficacité à la réaction et en causant

l'initiation de l'échange de brins aux endroits différents à l'intérieur du site de recombinaison ; ceci démontre une synergie entre Pre jouant un rôle dans la recombinaison site-spécifique et *rec*, ayant une fonction dans la recombinaison homologue (Gennaro et *al.*, 1987).

#### **4. Projet de Maîtrise**

Nous nous sommes intéressés au système de recombinaison Xer de *Staphylococcus aureus* pour plusieurs raisons. Tout d'abord, bien que les gènes codant ces protéines aient été identifiés, il y a beaucoup de mystère sur leur mode d'action au site *dif*. De plus, des mutations dans XerC ont été obtenues, mais aucune dans XerD, suggérant que ce gène pourrait être essentiel pour cet organisme. Les effets, s'il y en existe, des mutations *xer* sur la croissance ou pathogénicité de cette bactérie ne sont pas connus. Pour ces raisons, on a décidé d'étudier le système Xer de *S. aureus* en espérant de commencer à adresser certains de ces problèmes.

L'hypothèse du projet stipule que *S. aureus* possède les recombinases XerC et XerD, qui agissent ensemble au site *dif* afin de promouvoir une réaction de recombinaison site-spécifique, requise pour la croissance normale de cette bactérie. Des défauts dans ce système de recombinaison peuvent mener à une croissance réduite, ou, dans certains cas, le non viabilité.

Les expériences effectuées lors de la maîtrise incluent l'amplification des gènes *xerC* et *xerD* par PCR, et la purification de la protéine XerD exprimée à partir du gène *xerD* (protéine de fusion 6x His). Cette protéine purifiée a été

utilisée pour tester sa liaison à l'ADN-spécifique au site *dif*. On envisageait aussi de tester les deux protéines, XerC et XerD pour d'autres activités associées à des recombinases de type tyrosine (clivage de l'ADN, formation des complexes covalents protéine-ADN, activité d'échange des brins, interaction avec FtsK, etc.). Une fois l'activité de liaison de la protéine XerD au site *dif* de *E. coli* vérifiée, on a procédé à l'analyse de la liaison coopérative entre XerD de *S. aureus* avec XerC de *E. coli* et XerC de *Caulobacter crescentus*. On a aussi testé la capacité de complémentation de la protéine XerD de *S. aureus* dans une souche de *E. coli* mutante au niveau de *xerD*, soit la souche DS9008, et encore dans la même souche de *E. coli* contenant le plasmide pCS210, permettant de tester la complémentation au niveau de la recombinaison aux sites plasmidiques.

Ces expériences aideront à identifier l'importance du système Xer dans *S. aureus*, et pourront mener à la découverte de nouvelles cibles visées dans le développement des nouvelles thérapies antibactériennes.



## Chapter II

### Article

Cloning and Characterization of *Staphylococcus aureus xerD* gene

Keywords: site-specific recombination, XerD, *dif*, *Staphylococcus aureus*

Alexandra Gustinelli and George Szatmari\*

Université de Montréal, 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; MBP: maltose binding protein; SDS: sodium dodecyl sulfate; TBE: tris-borate-EDTA buffer; V: volts

## Abstract

The Xer site-specific recombination system, present in a wide variety of bacteria, is involved in the monomerisation of bacterial replicons such as plasmids and chromosomes. This system is comprised of two tyrosine recombinases, XerC and XerD, which act in concert to convert dimeric chromosomes to monomers by acting at a specific site near the terminus of replication, a 28-30 bp DNA sequence called the *dif* site.

Genes coding for Xer proteins and their site of action have been identified in many gram positive and gram negative bacteria. The common bacterial pathogen *S. aureus* represents one of these gram positive bacteria harboring a XerC/D *dif* system. The recombination system in *S. aureus* is also found to contain the first example of an essential gene of the lambda-integrase family, *xerD* appearing to be required for viability. In this paper, we report the cloning and characterization of the *xerD* gene of *S. aureus*. This gene encodes a protein showing a significant similarity with the sequences of the XerD protein in  $\gamma$ -proteobacteria. This protein specifically binds to the chromosomal *dif* site of *E. coli* either alone or in cooperativity with the XerC protein of *E. coli* and has been shown to partially complement the mutated *xerD* gene in this same bacteria.

## 1.Introduction

In cells harboring circular chromosomes and homologous recombination systems, the generation of dimeric and multimeric chromosomes stems from an odd number of recombination events between chromosomes during DNA replication (Steiner and Kuempel., 1998). If not resolved, these multimeric forms can interfere with the appropriate partitioning of genetic material to daughter cells and give way to decreased growth rates due to these chromosome segregation defects (Péralis et *al.*, 2001). In *Escherichia coli*, the classical bacterial model, two recombinases, XerC and XerD, are essential for recombination at the chromosomal *dif* site (Blakely et *al.*, 1993) for the resolution of chromosome dimers to monomers.

The recombinases XerC and XerD are members of the lambda integrase family and display 37% amino acid identity. Members of this family are distinguished by invariant residues forming the RHRY tetrad (Nunes-Düby et *al.*, 1998), with three of these residues (R, H, and R) thought to be implicated in the activation of phosphodiester bonds in cleavage and ligation reactions (Parsons et *al.*, 1988; Pan and Sadowski, 1992) and the conserved tyrosine (Y) acting as the attacking nucleophile covalently linked to the DNA during the cleavage reaction (Pargellis et *al.*, 1988; Evans et *al.*, 1990). It is important to note that Xer-like members make up a subfamily of recombinases present in a

wide variety of Gram-negative and Gram-positive bacteria (Esposito and Scocca, 1997).

XerC and XerD act cooperatively in Xer-mediated rearrangements, binding with distinct specificities to the recombination site. The chromosomal *dif* site is a 28-bp sequence comprised of two 11-bp arms separated by a 6-bp central region, differing from plasmid recombination sites which contain an 6-8-bp central region (Blakely et al., 1991; Blakely et al., 1993). An imperfect palindrome, the *dif* site's left and right halves are bound by XerC and XerD respectively. It is the cooperative protein-protein interaction of these recombinases that ensure the stability of the synapsis. The  $\gamma$  domain of the cell division protein FtsK has been shown to activate XerD in order to cleave the first DNA strand, generating a 3' phosphotyrosyl covalent complex. The then free 5' hydroxyl on the cleaved strand serves as the nucleophile, enabling the religation following strand exchange to generate a Holliday junction. The subsequent isomerization of the Holliday junction permits XerC to follow through with a second strand exchange for the resolution of the intermediate structure (Blakely and Sherratt, 1994; Aussel et al., 2002). This model for the coordination of dimer resolution has been elaborated in *E. coli* and interactions between the *E. coli dif* site and XerCD recombinases of *Haemophilus influenza* (Neilson et al., 1999), *Pseudomonas aeruginosa* (Blakely et al, 2000), *Bacillus subtilis* (Schiocetti et al., 2001), *Proteus mirabilis* (Villion and Szatmari,

2003), *Caulobacter crescentus* (Jouan and Szatmari, 2003), and *Vibrio cholerae* (Val et al., 2008) have been demonstrated *in vitro*. These observations have helped lead to the common notion that Xer recombination is a function conserved among eubacteria harboring circular chromosome(s).

*Staphylococcus aureus* represents one of these bacteria containing a circular chromosome shown to possess the Xer recombination system. *S. aureus* is a Gram-positive bacterium implicated in a wide range of illnesses from minor skin infections to life threatening diseases, such as pneumonia, meningitis, and toxic shock infections amongst others. It is also one of the most common causes of nosocomial infections with certain strains highly resistant to antibiotics, the strain MRSA (methicillin resistant) being one of the best characterized. The genes coding the XerC and XerD proteins have been identified in *S. aureus*, with XerD showing significant similarity to XerD of  $\gamma$ -proteobacteria. Furthermore, mutation analysis of the *xerCD* genes have demonstrated that mutating *xerC* leads to a decrease in cell size and a slow recovery from the stationary phase, coinciding with the segregation-deficient phenotype of *xerC*, *xerD*, and *dif* mutants of *E. coli* (Chalker et al., 2000). However, upon trying to obtain a *S. aureus xerD* mutant in allelic replacement mutagenesis studies, it was found that only *xerD* mutants containing a functional second gene copy of the wild-type *xerD* gene were viable. This

novelty represents the first example of an essential member of the lambda integrase family (Chalker *et al.*, 2000).

In this paper, we aim to better understand the XerD protein of *S. aureus* through its cloning and characterization and observe its interactions with the *E. coli dif* site and XerC and XerD of *E. coli* and *C. crescentus*.

## 2. Materials and Methods

### 2.1 Bacterial Strains and plasmids

The *Staphylococcus aureus* strain used in this study was a clinical isolate obtained from the university collection. The *xerD* gene was PCR amplified and cloned into the plasmid pQE31(Qiagen). The plasmid containing the *xerD* gene was introduced into *E.coli* T7 Express *lysY lacIq* (miniF-*lysY* (Cam<sup>R</sup>)/ *fhuA2 lacZ::T7 gene1 [lon] ompT gal sulA11 R (mcr-73::miniTn10—Tet<sup>S</sup>)2 [dcm] R(zgb-210::Tn10—Tet<sup>S</sup>) endA1 Δ(mcrC-mrr)114::IS10 [miniF-lysY (Cam<sup>R</sup>)]*) (New England Biolabs) by routine plasmid transformation. The transformed plasmid was then overexpressed and purified as an N-terminal his-tagged protein.

The *E. coli* strains used were T7 Express cells (NEB), with the *xerC* and *xerD* genes cloned into pRM130 and pGB500 plasmids. pRM130 is a pUC19 derivative containing the *xerD* gene of *E. coli* (Blakely et al., 1993). pGB500 is a pMAL-C2 derivative (NEB) containing the *xerC* gene of *E. coli* (Arciszweska and Sherratt, 1995). The plasmid pMAL-C2 (NEB) was used for cloning of *xerC* of *Caulobacter crescentus* (Jouan and Szatmari, 2003). These plasmids were transformed into T7 Express cells (NEB) and used for the overexpression and purification of *xerC* as a MBP fusion protein and *xerD* as a purified protein under native conditions (purification using Ni-NTA) (Colloms et al., 1996). The 33 base pair minimal PCR-amplified *E. coli dif* site used in

this study was cloned in pUC18 (Blakely et al., 1991). For complementation assays, the *E. coli* strains used were *E. coli* DS9008, a derivative of DS941, *xerD2:: mini-Tn10-9, Km<sup>R</sup>* (Blakely et al., 1993) and *E. coli* DS9008 containing the 2-*cer* reporter plasmid pCS210 harboring the *lacZ* reporter gene (Stirling et al., 1989).

## 2.2 Growth conditions and DNA manipulations

Bacteria were grown in Luria-Bertani (LB) broth (DIFCO), autoinducible medium (4.76% Terrific Broth, 0.4% Glycerol, 0.2% Lactose monohydrate, 0.05% Glucose, and 2mM MgSO<sub>4</sub>) (Studier, 2005) or plated on LB agar containing the appropriate antibiotics when required. *Staphylococcus aureus* was grown at 37°C in LB broth. Restriction enzymes, T4 polynucleotide kinase, and DNA ligase were obtained from New England Biolabs (NEB) and used according to the supplier's conditions. All routine DNA manipulations were performed as described in Ausubel et al., 1987 and Sambrook et al., 1989. DNA fragments were extracted from agarose gels using the QIAquick gel extraction kit (Qiagen) according to the manufacturer's conditions. Plasmids were extracted and purified using the QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen) according to the manufacturer's conditions.



### 2.3. Polymerase chain reaction (PCR) conditions

PCR reactions were carried out using a Labnet MultiGene PCR Gradient Thermal Cycler with Taq DNA polymerase (New England Biolabs) or High Fidelity Phusion DNA polymerase (New England Biolabs) according to the supplier's conditions. For the amplification of the *E. coli dif* site (pMin33), for DNA-binding assays, the cycling conditions were: 95°C/1 min followed by 95°C/15s, 57°C/30s and 72°C/30s for 30 cycles, with a final extension at 75°C/5 min. The reaction was performed in 100 µl with pMin33 DNA 1 µg/µl using Taq DNA polymerase, with the following primers: M13F-40PCR (CGCCAGGGTTTTCCAGTCACGAC) and M13R-48HEX5' (AGCGGATAACAATTTACACAGGA).

For the amplification of the *xerD* gene of *Staphylococcus aureus*, cycling conditions were 98°C/1 min followed by 98°C/15s, 53.3°C/30s and 72°C/3 min for 30 cycles, with a final extension at 72°C/5 min using High-Fidelity Phusion DNA polymerase. The reaction was carried out in 50 µl using *S. aureus* genomic DNA with the following primers: SaXerDF (CAGCTGCAGATGGAAACAATTATTGAAG) and SaXerDR (CGCAAGCTTATGCTCTAGGATGAAATTG). The PCR product was then digested with restriction enzymes HindIII and PstI (New England Biolabs), purified, and ligated into pQE31 (also digested with HindIII and PstI). The

product was then transformed into *E. coli* T7 Express cells with plasmid clones verified by DNA sequencing.

Fluorescently-labelled nucleotides were obtained from Alpha DNA, Montreal, QC and unlabelled nucleotides, including those used for amplifying the *S. aureus xerD* gene, were obtained from BIOcorp, Montreal, QC.

#### 2.4 Protein overexpression

Clones expressing the *xerD* gene (GenBank accession number AF093548) of *Staphylococcus aureus*, the *xerC* gene of *Caulobacter crescentus* and *xerC* and *xerD* genes of *Escherichia coli* were introduced into *E. coli* T7 Express cells. 5 ml of an overnight culture was used to inoculate 100 ml of autoinducible medium containing ampicillin and MgSO<sub>4</sub> (Studier, 2005) for overnight induction. Once harvested by centrifugation, pellets were resuspended in TM buffer (10mM Tris-HCl pH7.5, 10mM MgCl<sub>2</sub>). Following a freeze-thaw cycle, complete Mini protease inhibitor cocktail tablets, EDTA-free (Roche Diagnostics) were added. The resuspended cells were then sonicated and centrifuged at 13, 000 x g at 4°C. Supernatants were passed through an amylose column prepared according to the manufacturer's conditions (GE Healthcare) for the proteins XerC of *E. coli* and *C. crescentus* (MBP fusion proteins) or using the Ni-NTA spin kit (QIAGEN) for the His-Tagged proteins (XerD *S. aureus*) and XerD of *E. coli*. Proteins were separated

by SDS-PAGE on 12.5 % gels and visualized by staining with Coomassie blue. Most of the protein eluted in the first two fractions and was more than 80% pure.

## 2.5 DNA-binding assay

Specific DNA binding was determined by a gel retardation assay (Jouan and Szatmari, 2003) using fluorescently-labelled specific DNA fragments that were purified on an agarose gel after PCR using the primers M13F-40PCR and M13R-48HEX5' (see PCR conditions). Reaction conditions consisted of 4ng of specific-labeled DNA, 1µg polydIdC (Roche) in TENg-binding buffer (1M Tris-HCl pH 7.5, 500mM EDTA, 2.5M NaCl, and 50% glycerol) and increasing *E. coli* XerD, *E. coli* XerC, and *Staphylococcus aureus* XerD concentrations. Reactions, consisting of 20 µL, were incubated for 30 min at 37°C before protein-DNA complexes were separated on a 5% polyacrylamide gel at 4°C in 0.5 x TBE buffer at 85 V. For DNA-binding assays using *ccXerC*, *Caulobacter crescentus* XerC, reactions used 4ng of specific-labeled DNA and 125 ng polydIdC in TENg-binding buffer with increasing *ccXerC* concentrations. Incubation was for 60 min at 30°C before loading onto 5% polyacrylamide gel at 4°C in 0.25 x TBE buffer at 90 V. After electrophoresis, wet gels were scanned with a Typhoon Trio Imager and processed using ImageQuant software.

## 2.6 Complementation assays

The *xerD* gene was cloned into pQE31 and transformed into the *E. coli* strains DS9008 and DS9008 pCS210. LB broth cultures containing 100  $\mu\text{g ml}^{-1}$  of ampicillin (strain DS9008) and 100  $\mu\text{g ml}^{-1}$  of ampicillin and 50  $\mu\text{g ml}^{-1}$  of tetracycline (DS9008 pCS210) were used to grow the colonies obtained from the transformations and used for preparing DAPI-stained smears for microscopic observations. This was done by fixing the cells with 77% ethanol (EtOH) followed by the spreading of the fixed cell samples onto 0.1 % (wt/vol) poly-L-lysine treated coverslips to dry. The dried bacterial DNA was then stained with 4'6-diamidino-2-phenylindole (DAPI). The stained slide smears were visualized using a fluorescence microscope (Nikon Eclipse E600), with standard DAPI filter sets, in order to observe filamentation phenotypes (for DS9008). For the strain DS9008 pCS210, after routine plasmid transformation with the *xerD* cloned into pQE31, the plasmids were extracted according to the manufacturer's conditions with the QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen) and digested with the restriction enzyme HindIII (New England Biolabs) in order to view recombination activity at the *cer* sites of pCS210.

### 3. Results and Discussion

The Xer site-specific recombination system is implicated in the monomerisation of bacterial replicons, such as chromosomes and plasmids, in a large variety of bacteria, thus assuring a stable inheritance of these circular replicons prior to cell division (Blakely *et al.*, 1991; 1993; Kuempel *et al.*, 1991). Here we report the study of certain aspects of the Xer system in *S. aureus*, a bacterium harboring the first example of an essential member of the lambda integrase family, *S. aureus xerD*.

#### Analysis of *S. aureus dif* site

The *S. aureus dif* site can be described as an imperfect palindrome having two 11-bp half sites separated by a 6-bp central region. Upon aligning the *S. aureus dif* site with *dif* sites from *Bacillus subtilis*, *E. coli*, and *C. crescentus* (Fig. 2), we observe a high level of conservation among the different bacteria's right half-sites and central regions, with 9 out of 11 bp and 5 out of 6 bp respectively matching to the *dif* site of *E. coli*. The left half sites demonstrate a higher convergence. The observed similarities permit us to perform binding assays of the XerD protein of *S. aureus* using the *dif* site of *E. coli*. Furthermore, knowing that in *E. coli*, XerC has a higher affinity to the left half-site and XerD has a higher affinity to the right half-site of the *E. coli dif* site (Blakely *et al.*, 1993; Blakely and Sherratt, 1996), we can confirm that the sequence similarity of the right half-sites between *S. aureus* and *E. coli*

probably explains the observed high affinity binding of *S. aureus* XerD to the *E. coli dif* site.

#### DNA binding activity- *S. aureus* XerD with *E. coli dif*

The XerD protein of *S. aureus* was cloned and expressed as an N-terminal 6-his tagged protein. In order to resolve chromosome dimers, this Xer recombinase must bind to the right half-site of the *dif* site (Blakely et al., 1993). As the *S. aureus dif* site has not yet been characterized for use in gel retardation assays, the *E. coli dif* site was used to observe binding activity of the XerD protein of *S. aureus* to the *E. coli dif* site in gel retardation assays. Previously, the *E. coli dif* site has been shown to bind Xer recombinases of several species such as *H. influenzae* (Voziyanov et al., 1999), *B. subtilis* (Sherratt et al., 1995), and *C. crescentus* (Jouan and Szatmari, 2003). To test the DNA binding ability of *S. aureus* XerD to the *dif* site, the purified protein was incubated with the 5'Hex-labelled site of *E. coli*. In Fig. 3, we observe that 29 nM of *S. aureus* XerD is sufficient to detect the formation of a DNA-protein complex and give a retardation of the *E. coli dif* site. Not surprisingly, the concentration of *S. aureus* XerD required for the detection of a DNA-protein complex is not very high, probably due to the fact that, though the *E. coli dif* site is not the natural substrate for the XerD protein of *S. aureus*, the *dif* sites of *E. coli* and *S. aureus* are highly similar (seen in Fig. 2). Interestingly, as the concentration of *S. aureus* XerD increases, the simultaneous formation of

more than one XerD-*E. coli dif* complex is observed. The complex migrating the fastest probably represents one monomer of XerD bound to the *dif* site, the second fastest XerD binding to the half-sites of *dif* specific to XerD and XerC binding, the third, the binding of two monomers of XerD, followed by a complexes representing the binding of the XerD protein to the XerC specific half-site and two monomers of XerD to the XerD specific half-site and finally unspecific binding to the *dif* site. This proposed hypothesis is based on the previous observation that *E. coli* XerD saturates the *dif* site, first by one monomer of XerD before a second monomer binds to the complex XerD-*dif* (Blakely et al., 1993). The results from Fig. 3 show that the gene product of *S. aureus xerD* codes for a protein able to specifically bind to the chromosomal *dif* site. In order to further confirm that the observed retardation of *dif* is in fact a specific DNA-protein interaction, a negative control non-specific labeled DNA fragment was used. The fragment did not allow for any significant retardation, suggesting that the retardation observed in Fig. 3 is due to specific binding (data not shown). Furthermore, the fact that around 200-fold excess of polyIdC to DNA was used in the reaction confirms that the complexes seen represent specific protein-DNA binding, as any nonspecific binding would be drawn to the synthetic molecule.

### Cooperative Binding

In order to establish conditions for the cooperative binding tests using *S. aureus* XerD with the *dif* site of *E. coli*, we tested the cooperative binding of *E. coli* XerC and XerD to this *dif* site. It has been previously shown that Xer recombinases bind cooperatively to their recombination site, with XerD binding first to the right half-site, changing the conformation of the complex, thus giving way for the binding of XerC to the left half-site (Blakely and Sherratt, 1994). This was observed by first using a constant amount of XerC (265 nM) and increasing XerD concentrations (Fig. 4a). As expected, a retarded fragment with a different mobility than that found for the individual binding of either XerC or XerD is seen in Fig. 4a. The same pattern, of a retarded fragment having a different mobility than that found for the individual binding of either Xer recombinase, was observed when *E. coli* XerD was at a constant concentration (115 nM), upon the addition of increasing XerC concentrations (Fig. 4b).

Once the parameters of the known cooperative binding for *E. coli* XerC and XerD to *E. coli dif* were established, we were able to analyze the cooperative binding using the XerD protein of *S. aureus*. First, a constant amount of *E. coli* XerC (133 nM) with increasing amounts of *S. aureus* XerD was used (Fig. 5a). Cooperative binding of the XerC protein of *E. coli* and the XerD protein of *S. aureus* on the *E. coli dif* site was observed. We note that *E.*



*coli* XerC and *S. aureus* XerD bind separately to the *E. coli dif* site (lanes 2 and 3 respectively). Upon incubating the two recombinases together (lanes 4 to 9), a retarded fragment was observed with a different mobility than that found for the individual binding. The presence of a larger, slower migrating complex (best seen in lanes 5 through 9), not present in retardations of XerC or XerD to the *dif* site even at high protein concentrations, was seen. The slower migrating complex appeared only when the two proteins were incubated together and at concentrations that generate different shifts when the proteins are assayed alone, thus suggesting that the complex is a result of the binding of both *E. coli* XerC and *S. aureus* XerD to the *E. coli dif* site. Even at concentrations as low as 29 nM of *S. aureus* XerD seen in Fig. 5a (lane 9), the cooperative binding of the two recombinases remained rather strong, also observed when *E. coli* XerC and XerD bind cooperatively. This observation leads us to the confirmation that *S. aureus* XerD is similar to *E. coli* XerD and is able to bind and interact with its partner recombinase XerC (the C-terminal regions of the recombinases being key to the cooperative binding) (Figure 1). We observe the same pattern of a larger, slow migrating complex in the binding reaction when *S. aureus* XerD is used at a constant concentration (231 nM), with increasing amounts of *E. coli* XerC (Fig. 5b). Taken as a whole, these data suggest that the binding of *S. aureus* XerD is able to stimulate the binding of *E. coli* XerC to the *E. coli dif* site.

In order to further characterize *S. aureus* XerD, we opted to verify its cooperative binding activity with another Xer recombination system. The system of *C. crescentus* contains the recombinases XerC and XerD and possesses a certain degree of similarity with the system of *E. coli*. It has been shown that *C. crescentus* XerC and XerD cooperatively bind to the *E. coli dif* site, and increasing amounts of *C. crescentus* XerD incubated with a constant amount of *E. coli* XerC display this same binding cooperativity on the *E. coli dif* site (Jouan and Szatmari, 2003), not unlike the cooperative binding we observed with *S. aureus* XerD and *E. coli* XerC. This observation led us to perform DNA binding assays using *C. crescentus* XerC. First, we verified the known binding ability (shown by Jouan and Szatmari, 2003) of this recombinase with the *E. coli dif* site (Fig. 6) in order to establish specific binding conditions. Since specific binding was observed using our conditions, with *C. crescentus* XerC binding best at a concentration of 550 nM, giving us the most distinct single band (Fig. 6), cooperative binding assays were performed using a constant concentration of *C. crescentus* XerC (550 nM) and increasing amounts of *S. aureus* XerD (Fig. 7) on the *E. coli dif* site. The results shown in Fig 7. indicate that there is no apparent slower migrating complex, different from the binding of either XerC or XerD alone on the *E. coli dif* site. The multiple bands seen in lanes 4 through 8 seem to represent the binding of *S. aureus* XerD, either as one monomer or two XerDs, to the *E. coli dif* site upon comparing them with the bands formed in lane 9 (*S. aureus* XerD alone

on the *E. coli dif* site). Therefore, from our results in Fig. 7, we conclude there is no cooperative binding between *C. crescentus* XerC and *S. aureus* XerD. Though *C. crescentus* XerC clearly does not inhibit the binding of *S. aureus* XerD to the *E. coli dif* site, it does not stimulate *S. aureus* XerD binding either. This may be due to a divergence at residues important for protein-protein interactions or, as previously mentioned, simply due to the poor binding of *C. crescentus* XerC to the *E. coli dif* site (Jouan and Szatmari, 2003). The stimulation of binding, indicating compatibility amongst the recombinases from two different Xer recombination systems seems to exist only between *S. aureus* and *E. coli*, not between *S. aureus* and *C. crescentus*.

### Complementation Assays

Upon observing the cooperativity between *S. aureus* XerD and *E. coli* XerC, complementation assays were performed in order to test if the compatibility between these two Xer recombination systems extended to the actual recombination reaction for the resolving of multimers. From the observed results, transforming *S. aureus* XerD into the *E. coli* strain DS9008, mutant for *xerD*, eliminates the filamentation phenotype observed when no wild-type XerD protein is present (Fig. 8a). The XerD protein of *S. aureus* replaces the non-functional XerD of *E. coli* and succeeds in working alongside and in concurrence with the other members of the Xer recombination system (i.e. XerC and FtsK), present in the strain DS9008, at the chromosomal *dif* site,

for the resolving of dimeric chromosomes and the subsequent elimination of filamentation that arises as a consequence of a defect in the recombination system.

Despite the observed complementation upon introducing the *S. aureus* XerD protein for the resolving of chromosome dimers in the strain DS9008, this same protein is not capable of replacing the *E. coli* XerD when it comes to performing the recombination reactions at the *cer* plasmid recombination site, where a wild-type XerD is needed. A complementation assay in which the *S. aureus* XerD protein was transformed into the *E. coli* strain DS9008 pCS210 revealed the absence of *cer* recombination in this genetic background. The results in Fig.8b demonstrate the absence of complementation of the *E. coli* *xerD* mutant with a cloned copy of the *S. aureus xerD* gene. No recombination was observed; the first band in the wells representing the non-recombined plasmidic product, pCS210, and the second band representing the cloning vector carrying the *S. aureus xerD* gene. As confirmation, the recombined plasmid control, pCS211, was migrated alongside the transformants, displaying a band representative of the recombined plasmid not present in the other wells. The absence of *cer* complementation is probably due to inefficient or inexistent interactions between *S. aureus* XerD and *E. coli* XerC. In this case of *cer* recombination, cleavage and strand exchange mediated by XerC requires the presence but not the catalytic activity of XerD. It is also possible that *E. coli*

XerC is simply not cooperative with *S.aureus* XerD for plasmidic recombination as it was observed to be for chromosomal recombination, with *S.aureus* XerD not able to bind to the recombination site *cer* as it was with the chromosomal *dif* site. The absence of recombination at the plasmidic *cer* sites of the plasmid pCS210 is probably due to the fact that plasmidic recombination requires other accessory factors not needed for chromosomal recombination. The accessory factors necessary may not be compatible with the XerD protein of *S. aureus* as the chromosomal recombination proteins were.

Further studies using the *dif* site of *S. aureus* may help us to better understand the recognition of DNA by the recombinases and their assembly prior to performing the recombination reaction. Moreover, with XerC of *S. aureus*, we can begin to analyze the interactions between the two recombinases and their roles in the cleavage and resolution reactions, therein shedding light on the recombination process in *S. aureus*.

#### **4.Acknowledgements**

We would like to thank the Natural Science and Engineering Research Council of Canada for providing us with an operating grant and Maxime Leroux for his assistance and advice throughout.

## 6. References

- Arciszewska, L.K. and Sherratt, D.J.** 1995. Xer site-specific recombination *in vitro*. EMBO J. 14, 2112-2120.
- Aussel, L., Barre, F.X., Aroyo, M., Stasiak, A., Stasiak, A.Z., and Sherratt, D.J.** 2002. FtsK is a DNA motor protein that activates chromosome dimer resolution by switching the catalytic state of the XerC and XerD recombinases. Cell. 108:195-205.
- Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., and Struhl, K.** 1987-1997. Current protocols in molecular biology, Wiley, New-York.
- Blakely, G., Colloms, S.D., May, G., Burke, M. and Sherratt, D.J.** 1991. *Escherichia coli* XerC recombinase is required for chromosomal segregation at cell division. New Biol. 3:789-798.
- Blakely, G., Davidson, A.O., and Sherratt, D.J.** 2000. Sequential strand exchange by XerC and XerD during site-specific recombination at *dif*. J. Biol. Chem. 275:9930-9936.
- Blakely, G., May, G., McCulloch, R., Arciszewska, L.K., Burke, M., Lovett, S.T. and Sherratt, D.J.** 1993. Two related recombinases are required for site-specific recombination at *dif* and *cer* in *E. coli* K12. Cell 75:351-361.

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

**Blakely, G., and Sherratt, D.J.** 1996. Determinants of selectivity in Xer site-specific recombination. *Genes Dev.* 10:762-773.

**Chalker, A.F., Lupas, A., Ingraham, K., So, C.Y., Lunsford, R.D., Li, T., Bryant, A., Holmes, D.J., Marra, A., Pearson, S.C., Ray, J., Burnham, M.K.R., Palmer, L.M., Biswas, S., and Zalacain, M.** 2000. Genetic Characterization of Gram-Positive Homologs of the XerCD Site-Specific Recombinases. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 2 (2):225-233.

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

**Esposito, D. and Scocca, J.J.** 1997. The integrase family of tyrosine recombinases: evolution of a conserved active site domain. *Nucleic Acids Res.* 25:3605-3614.

**Evans, B.R., Chen, J.W., Parsons, R.L., Bauer, T.K., Teplow, D.B., and Jayaram, M.** 1990. Identification of the active-site tyrosine of Flp recombinase. *J. Biol. Chem.* 265:18504-18510.



- Jouan, L., and Szatmari, G.** 2003. Interaction of *Caulobacter crescentus* XerC and XerD recombinases with the *E. coli dif* site. FEMS Microbiol. Lett. 222: 257-262.
- Kuempel, P.L., Henson, J.M., Dircks, L., Teckleberg, M., and Lim, D.F.** 1991. *dif*, a *recA*-independent recombination site in the terminus region of the chromosome of *Escherichia coli*. New Biol. 3:799-811.
- Neilson, L., Blakely, G.W., and Sherratt, D.J.** 1999. Site-specific recombination at *dif* by *Haemophilus influenzae* XerC. Mol. Microbiol. 31:915-926.
- Nunes-Düby, S.E., Kwon, H.J., Tirumalai, R.S., Ellenberger, T., and Landy, A.** 1998. Similarity and differences among 105 members of Int family site-specific recombinases. Nucleic Acids Res. 26:391-406.
- Pan, G., and Sadowski, P.D.** 1992. Ligation activity of Flp recombinase. J. Biol. Chem. 267:12397-12399.
- Pargellis, C.A., Nunes-Düby, S.E., de Vargas, L.M., and Landy, A.** 1988. Suicide recombination substrates yield covalent lambda integrase-DNA complexes and lead to identification of the active site tyrosine. J. Biol. Chem. 263 (16):7678-7685.

- Parsons, R., Prasad, P.V., Harshey, R.M., Jayaram, M.** 1988. Step-arrest mutants of Flp recombinase: implications for the catalytic mechanism of DNA recombination. *Mol. Cell. Biol.* 8:3303-3310.
- Péral, K., Capioux, H., Vincourt, J.B., Louarn, J.M., Sherratt, D.J., and Cornet, F.** 2001. Interplay between recombination, cell division and chromosome structure during chromosome dimer resolution in *Escherichia coli* *Mol. Microbiol.* 39:904-913.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T.** 1989. *Molecular cloning : a laboratory manual*, 2<sup>nd</sup> edn., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Schiochetti, S.A., Piggot, P.J., and Blakely, G.W.** 2001. Identification and characterization of the *dif* site from *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 183:1058-1068.
- Sherratt, D.J., Arciszewska, L.K., Blakely, G., Colloms, S., Grant, K., Leslie, N., and McCulloch, R.** 1995. Site-specific recombination and circular chromosome segregation. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 347:37-42.
- Steiner, W.W., and Kuempel, P.L.** 1998. Cell division is required for resolution of dimer chromosomes at *dif* locus of *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 27:257-268.

**Stirling, C.J., Colloms, S., Collins, J.F., Szatmari, G., and Sherratt, D.J.** 1989. *XerB*, an *Escherichia coli* gene required for plasmid Cole1 site-specific recombination, is identical to *pepA*, encoding aminopeptidase A, a protein with substantial similarity to bovine lens leucine aminopeptidase. EMBO J. 8:1623-1627.

**Studier, F.W.** 2005. Protein production by auto-induction in high density shaking cultures. Protein Expr Purif. 41(1):207-234.

**Val, M.E., Kennedy, S.P, Karoui, M.E., Bonne, L., Chevalier, F., and Barre, F.X.** 2008. FtsK-Dependent Dimer Resolution on Multiple Chromosomes in the Pathogen *Vibrio cholera*. Plos Genet 4 (9): e1000201. Doi:10.1371/journal.pgen.1000201.

**Villion, M., and Szatmari, G.** 2003. The XerC recombinase of *Proteus mirabilis*: Characterization and interaction with other tyrosine recombinases. FEMS Microbiol Lett. 226:65-71.

**Voziyanov, Y., Pathania, S., and Jayaram, M.** 1999. A general model for site-specific recombination by the integrase family recombinases. Nucleic Acids Res. 27:930-941.

## 7. Figure Legends

Fig. 1 Amino acid alignment of *E. coli* and *S. aureus* C-terminal domains of XerC and XerD. Alignments were done using the LALIGN program [http://www.ch.embnet.org/software/LALIGN\\_form.html](http://www.ch.embnet.org/software/LALIGN_form.html). Vertical lines (|) represent identity; double dots (:) represent a high degree of similarity; and single dots (.) represent less similarity between amino acids.

Fig. 2. Alignment of *dif* recombination sites

*dif* site alignments with sequences of central regions in boldface type.

Fig. 3. Gel retardation analysis of binding of XerD of *S. aureus* with *ecdif*.

Reactions were incubated for 30min at 37°C as described in Materials and Methods. The concentrations of *saXerD* are indicated above each lane in nM. The reactions all contained 4ng of Hex-labeled *ecdif* fragments and 1µg polydIdC.

Fig. 4. Gel retardation analysis of cooperative binding of *ecXerC* and *ecXerD* with *ecdif*.

Reactions were incubated for 30min at 37°C as described in Materials and Methods. The concentrations of *ecXerC* and *ecXerD* are indicated above each lane in nM. All reactions contained 4ng of Hex-labeled *ecdif* fragments and 1µg polydIdC.

A: *ecXerC* at a constant concentration (265 nM) was incubated with *ecXerD* at concentrations of 3.7  $\mu$ M, 115 nM, 58 nM, 29 nM, 14 nM and 7 nM  
 B: *ecXerD* at a constant concentration (115 nM) was incubated with *ecXerC* at concentrations of 8.5  $\mu$ M, 265 nM, 133 nM, 66 nM, 33 nM and 17 nM.

Fig.5. Gel retardation analysis of cooperative binding of *ecXerC* and *saXerD* with *ecdif*.

Reactions were incubated for 30min at 37°C as described in Materials and Methods. The concentrations of *ecXerC* and *saXerD* are indicated above each lane in nM. All reactions contained 4ng of Hex-labeled *ecdif* fragments and 1 $\mu$ g polyIdC.

A: *ecXerC* at a constant concentration (133 nM) was incubated with *saXerD* at concentrations of 3.7  $\mu$ M, 462 nM, 231 nM, 115 nM, 58 nM and 29 nM  
 B: *saXerD* at a constant concentration (231 nM) was incubated with *ecXerC* at concentrations of 8.5  $\mu$ M, 265 nM, 133 nM, 66 nM, 33 nM and 17 nM.

Fig.6. Gel retardation analysis of binding of XerC of *C. crescentus* with *ecdif*.

Reactions were incubated for 60min at 30°C as described in Materials and Methods. The concentrations of *ccXerC* are indicated above each lane in

nM. The reactions all contained 4ng of Hex-labeled *ecdif* fragments and 125 ng of polydIdC.

Fig. 7. Gel retardation analysis of cooperative binding of *ccXerC* and *saXerD* with *ecdif*.

Reactions were incubated for 60min at 30°C as described in Materials and Methods. *ccXerC* at a constant concentration (550 nM) was incubated with *saXerD* at concentrations of 3.7  $\mu$ M, 462 nM, 231 nM, 115 nM, 58 nM, and 29 nM. The reactions all contained 4ng of Hex-labeled *ecdif* fragments and 125 ng of polydIdC.

Fig. 8 Analysis of Complementation of *E. coli xerD* mutant with *S. aureus* XerD

A: *S. aureus* XerD transformed into the *E. coli* strain DS9008 mutant for *xerD* B: *S. aureus* XerD (pQE31 *xerD*) transformed into the *E. coli* strain DS9008 pCS210 mutant for *xerD*. Extracted plasmids and control plasmids cut with HindIII were migrated on a 0.7% agarose gel.

Well 1: control, DS9008 pCS210

Well 2-6: DS9008 pCS210 pQe31*xerD* *S. aureus*

Well 7 : control, DS9008 pCS211

Well 8 : control, pQE31 *xerD* *S. aureus*

Well 9: 2-Log DNA ladder

Fig.1

```

      20      30      40      50      60      70
EcxcerC VRDRAMLEV MYGAGLR LSELVGLDIKHL DLESGEVV WVMGKGSKERRLP IGRNAVAV AIEHW
..... : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
SaxerC  LRDRVILE LLYATGIRVSELVN IKKQDIDFYANGVTIV LGLGKSKERFV PFGAYCRQSIENY
      20      30      40      50      60      70

      80      90     100     110     120     130
EcxcerC LD-LRDLFGS EDDALFLSKL GKRI SARNVQKRFAE WGIKQGLNNHV HPHKLRHSFATHML
.: . . . . . : : : . : : : . . . . . : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
SaxerC  LEHFKPIQ SCNHDFLILNMKGEA ITERGVRYVLNDIVKRTAGV SEIHPHKL RHTFFATHLL
      80      90     100     110     120     130

      140     150     160     170     180
EcxcerC ESSGDLRGV QELLGHANLSTTQ IYTHLDFQH LSAVYDAAHPRAKR
..... : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
SaxerC  NQGADLR TVQSLLGHVNLSTT GKYTHVSNQQL RKVYLN AHPRAKK
      140     150     160     170

      10      20      30      40      50      60
EcxcerD QVERLLQAP LIDQPLELRD KAMLEVLYATGL RVSELVGLTMS DISLRQGVVR VIGKGNKE
.: : : : : . . . : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
SaxerD  EVLALLE TPDLNKINGYR DRTMLELL YATGMRVSEL IHLELENVNLIMGFVR VFGKGDKE
      10      20      30      40      50      60

      70      80      90      100     110     120
EcxcerD RLVPLGEEA VYWLETYLEHGR P WLLNGVSIDV LFP SQRAQQMTRQT FWHRIKH YAVLAGI
: : : : : . . . : : : : : : : : : : . : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
SaxerD  RIVPLGDA VIEYLTTYI ETIRPQLL KKTIVTEV LFLNMHGK PLSRQAIW KM IKQNGVKANI
      70      80      90      100     110     120

      130     140     150     160     170     180
EcxcerD DSEKLSPHV LRHAFATHLL NHGADLRV VQMLLGHS DLSTTQIY THVATERL RQLHQQHHP
.. : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
SaxerD  -KKTLPHT LRHSFATHLL ENGADLR AVQEM LGHSDISTT QLYTHVSKS QIRKMYNQ FHP
      130     140     150     160     170

EcxcerD RA
      ::
SaxerD RA
      180
```

Fig. 2

<i>dif B.subtilis</i>	ACTTCCTAGAA- <b>TATATA</b> -TTATGTAAACT
<i>dif E.coli</i>	GGTGCGCATAA- <b>TGTATA</b> -TTATGTAAAT
<i>dif C.crescentus</i>	AAGATCGACTT- <b>TGTAAT</b> -TTATGTAAAGT
<i>dif S.aureus</i>	ACTTCCTATAA- <b>TATATA</b> -TTATGTAAACT



Fig. 3

SaXerD 0 3700 1850 925 462 231 115 58 29

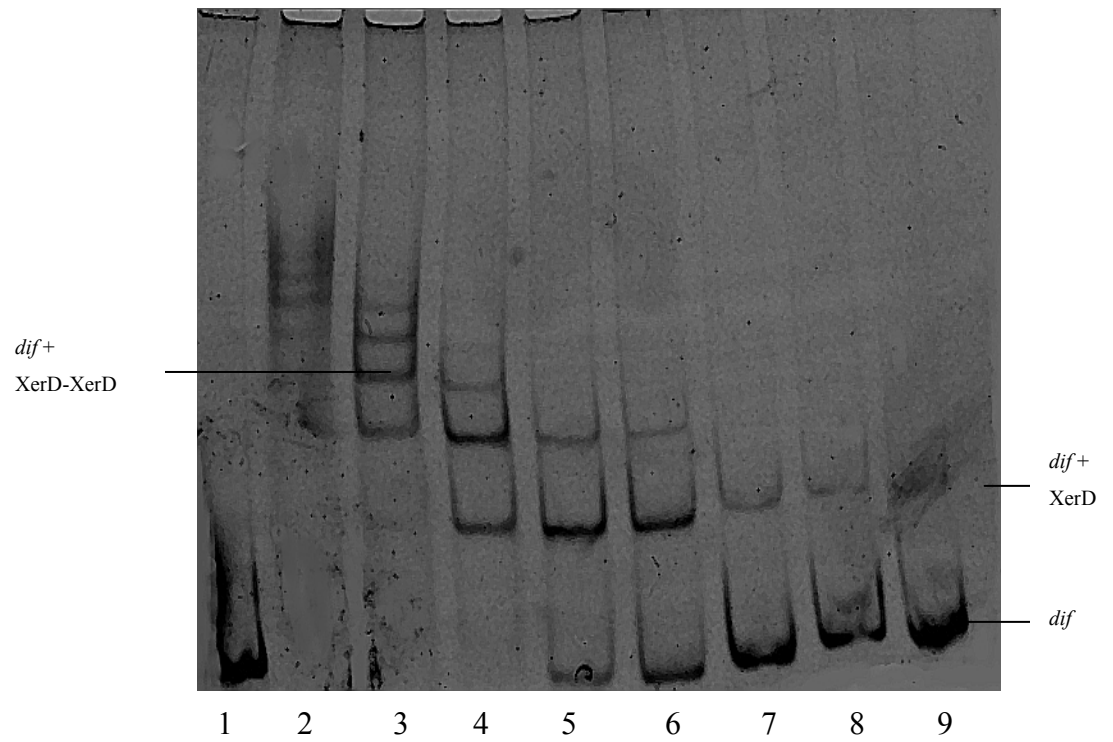
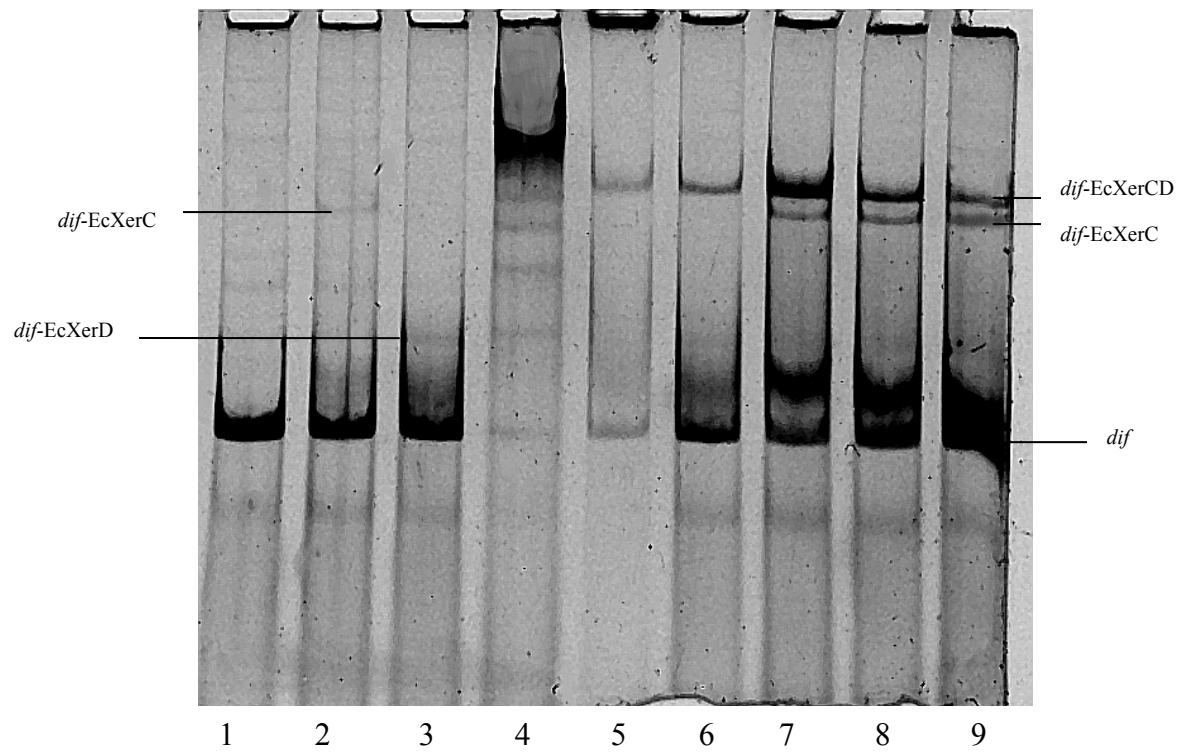


Fig. 4

A.

EcXerC	0	265	0	265	265	265	265	265	265
EcXerD	0	0	115	3700	115	58	29	14	7



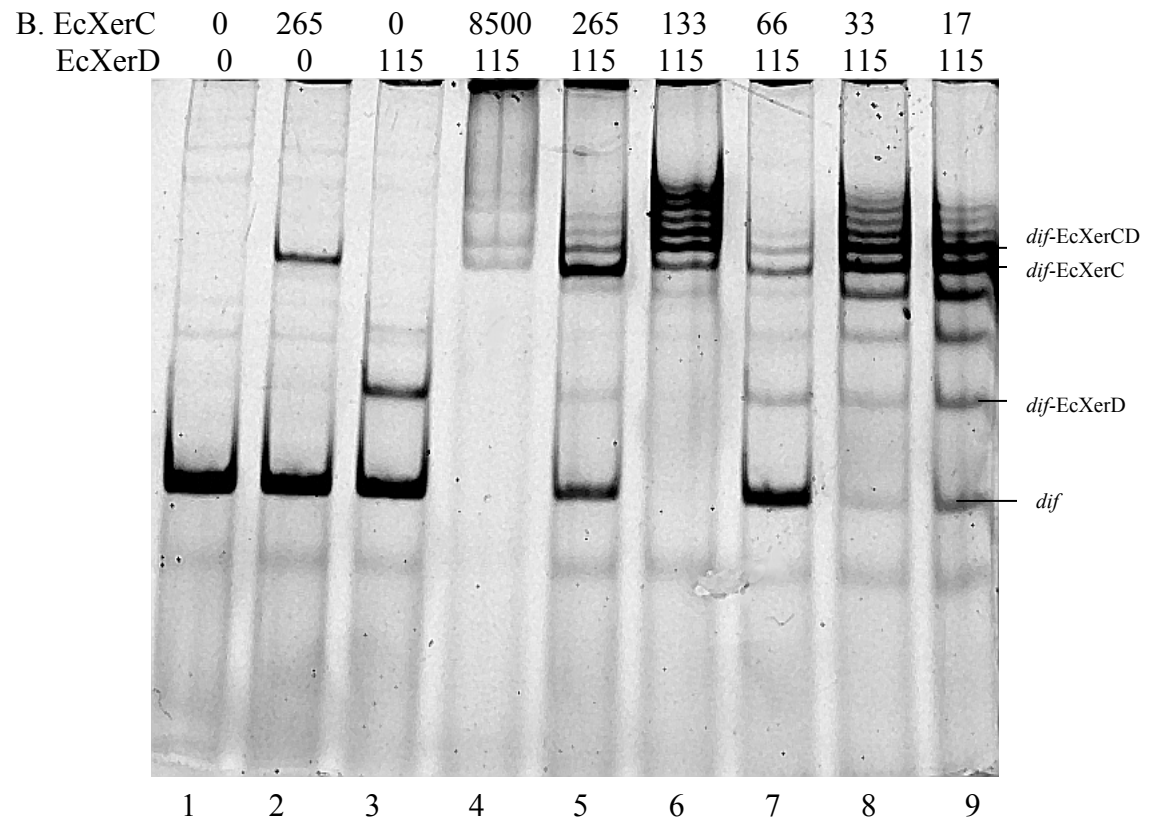
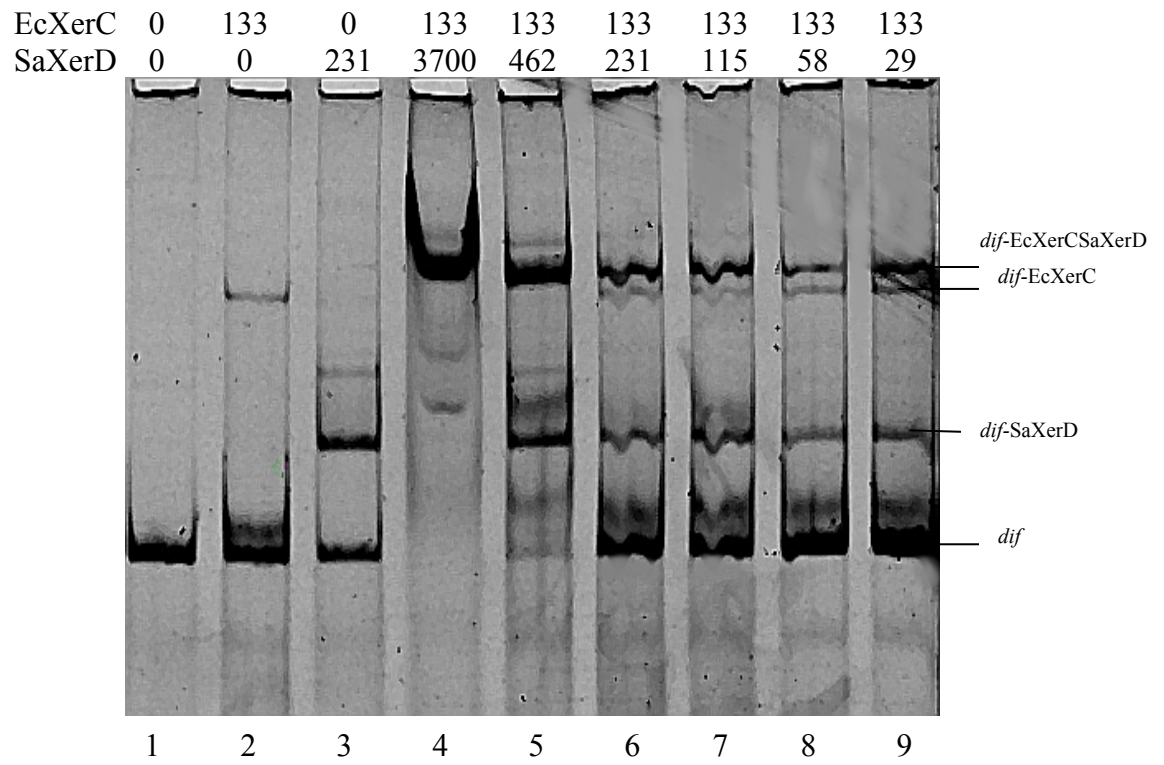


Fig. 5

A.



B.

EcXerC	0	0	8500	265	133	66	33	17	133
SaXerD	0	231	231	231	231	231	231	231	0

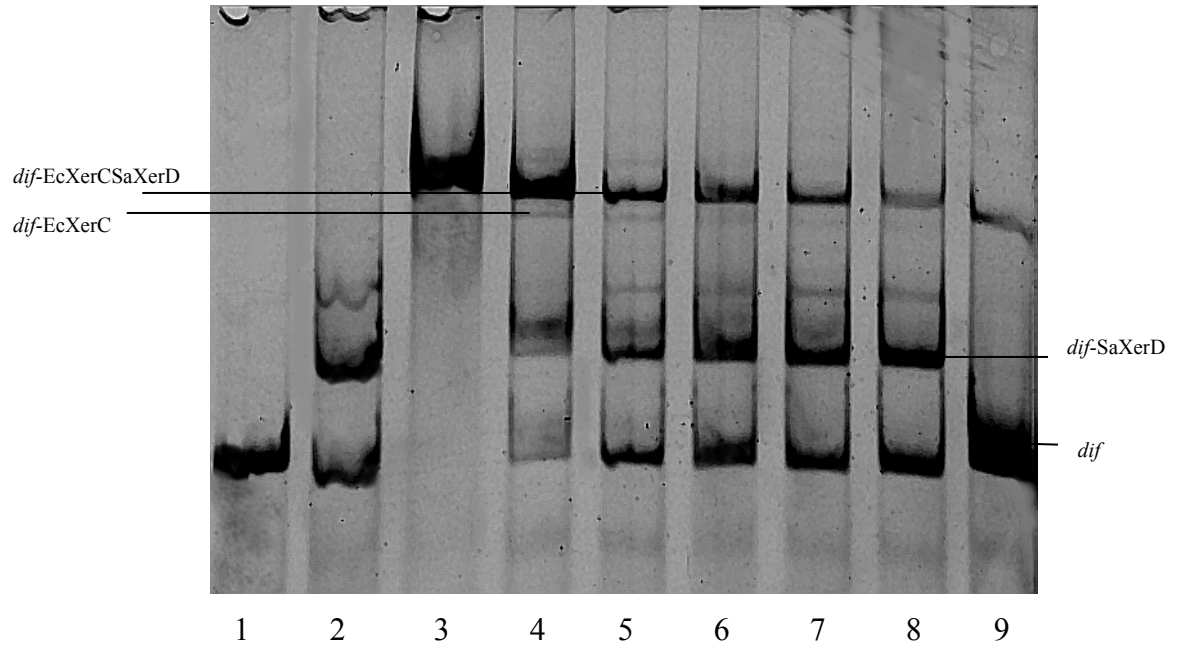


Fig. 6

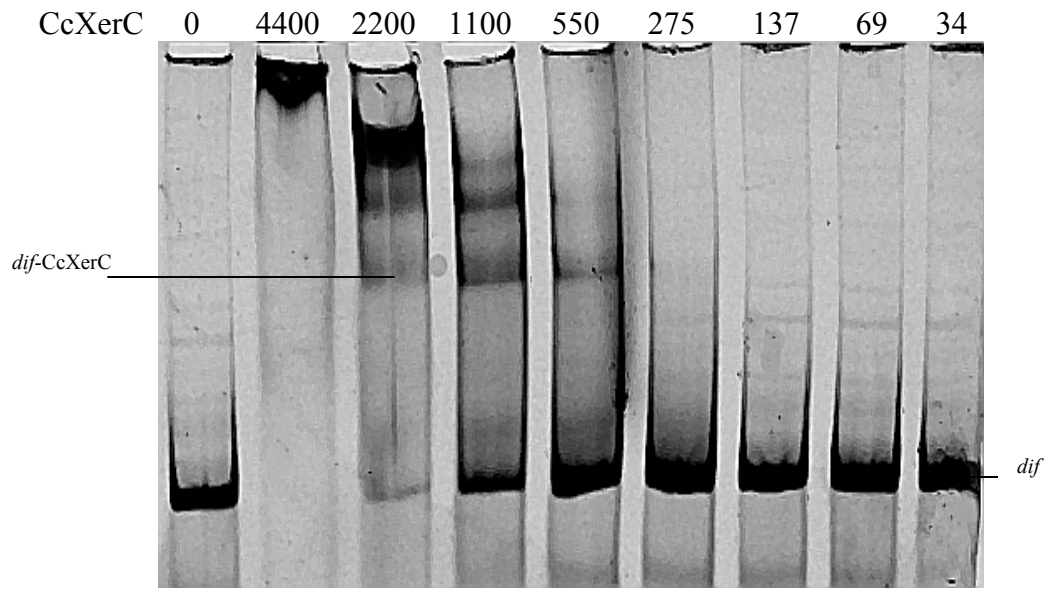


Fig. 7

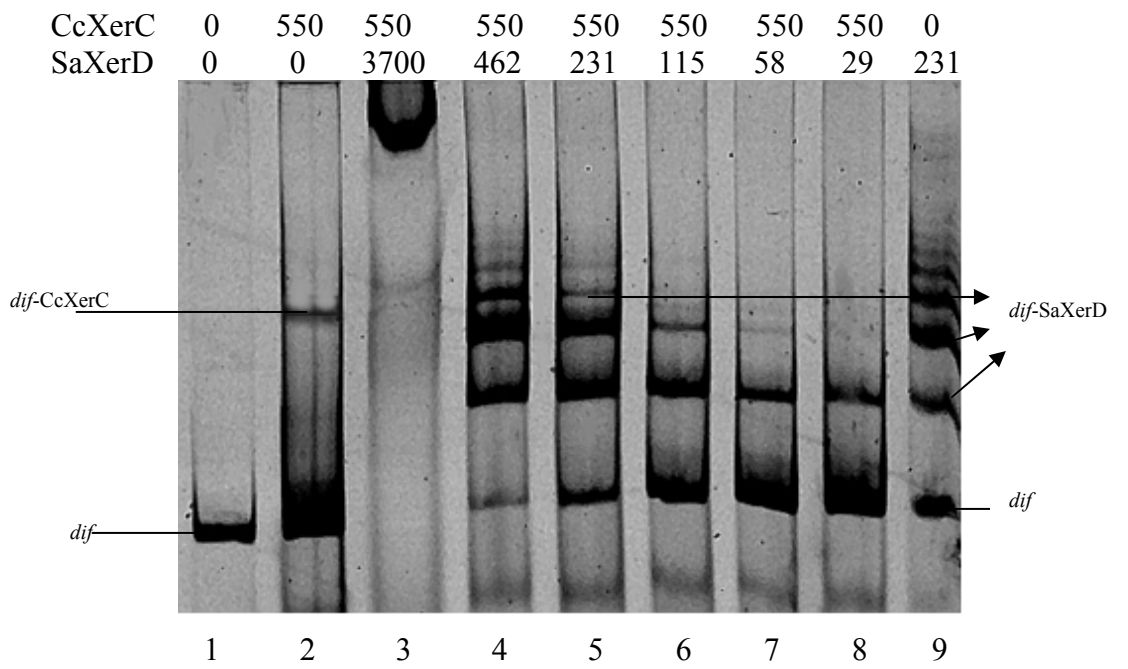
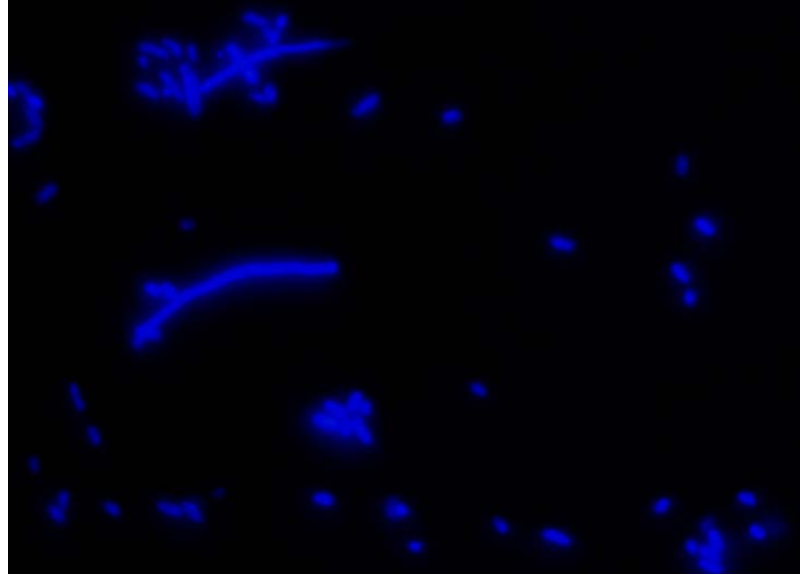
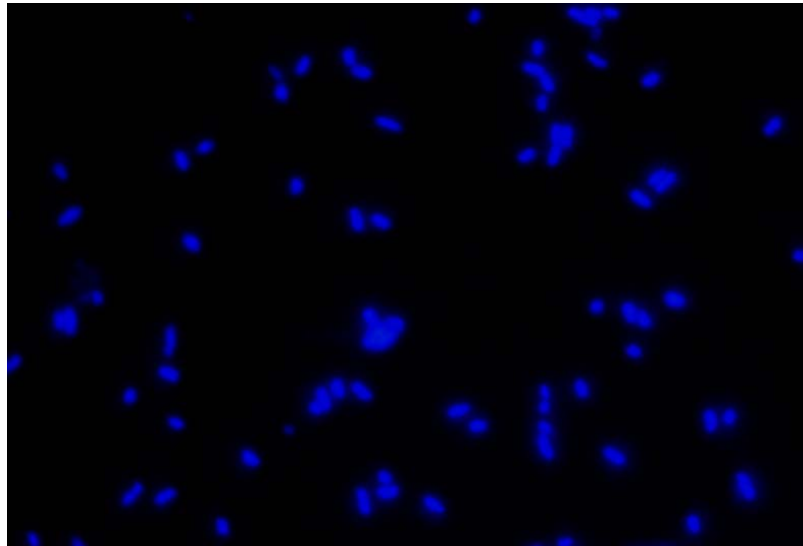


Fig. 8

A.

DS9008

DS9008 xerDpQE31 *S. aureus*





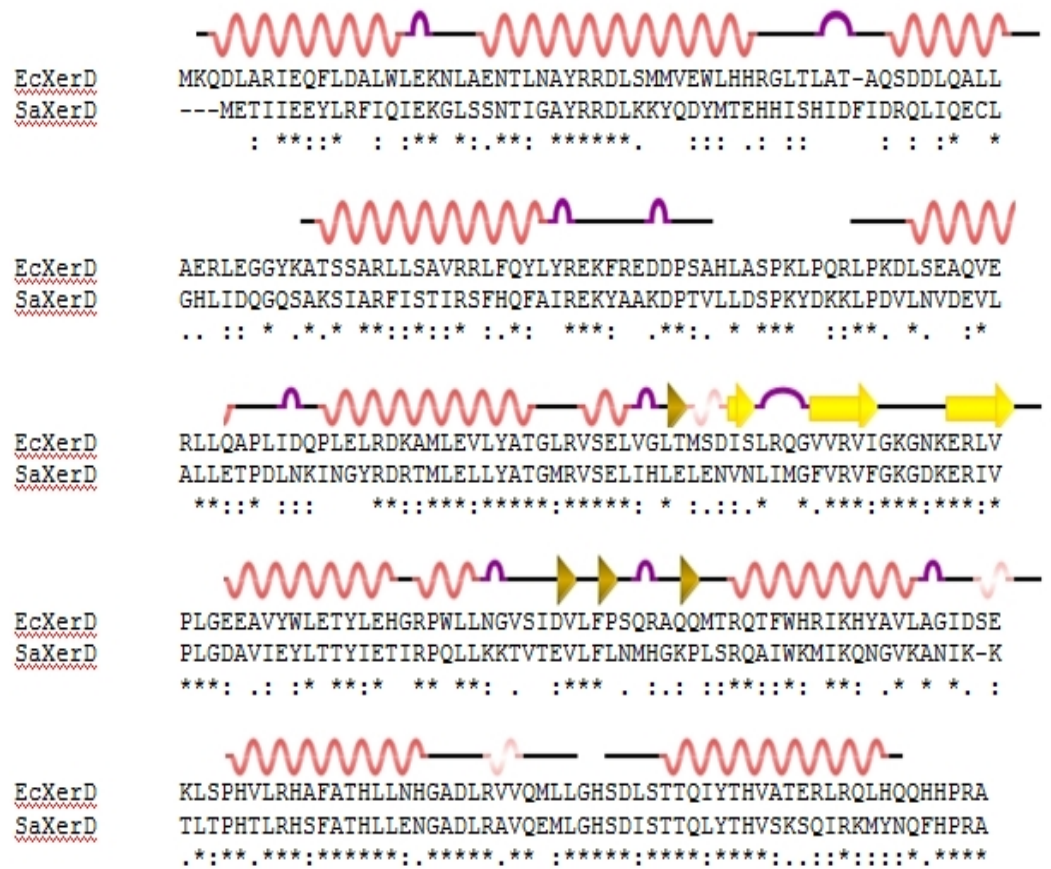
## Chapitre III

### Discussion

#### 1. Clonage du gène *xerD* de *Staphylococcus aureus*

En utilisant les amorces SaXerDF et SaXerDR, l'amplification du gène *xerD* a été effectuée et grâce au séquençage génomique, on a obtenu la séquence nucléotidique du gène. Cette séquence est composée à 33% de GC et code pour une protéine de 295 aa.

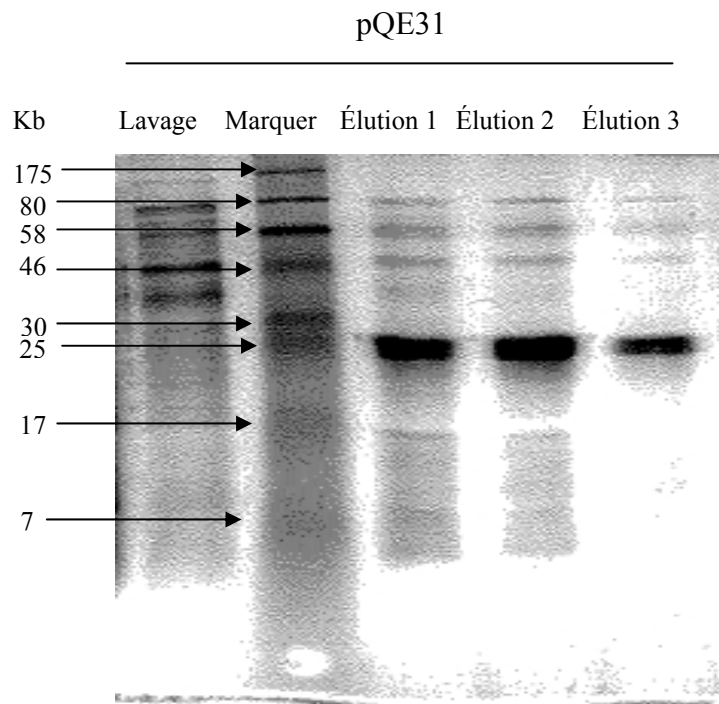
En comparant le gène *xerD* de *Staphylococcus aureus* avec d'autres recombinases de type Xer séquencées, ce dernier démontre une grande similarité de séquence. Notamment, il existe une homologie de 49 % en le comparant avec le *xerD* de *Escherichia coli* pour la séquence au complet et encore 57 % de homologie avec *xerD* de *Bacillus subtilis* (clustalw2 [www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index](http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index)). En tenant compte la divergence qui existe de façon évolutive entre les bactéries Gram-négatives et les bactéries Gram-positives, il est normal d'obtenir une plus grande identité de séquence entre *xerD* de *S. aureus* et *xerD* de *B. subtilis* qu'entre les recombinases de *S. aureus* et *E. coli* étant donné que *S. aureus* et *B. subtilis* sont toutes les deux des bactéries Gram-positives. Encore, la figure 12 nous montre la similarité entre les recombinases XerD de *E. coli* et *S. aureus* en comparant la séquence en acides aminés.



**Figure 12.** Alignement des acides aminés de la protéine XerD de *E. coli* et *S. aureus*. L'alignement était fait utilisant le programme Clustal Omega [http://www.ebi.ac.uk/Tools/services/web\\_clustalo/toolform.ebi](http://www.ebi.ac.uk/Tools/services/web_clustalo/toolform.ebi). Les lignes verticales (|) représentent l'identité; (:) représente un haut taux de similarité; et des points simples (.) représentent moins de similarité entre les acides aminés. Les protéines ont une identité de 44.2 %. Les hélices rouges représentent les hélices alpha et les flèches jaunes représentent les « beta sheets ». Positionnement des hélices et « beta sheets » tiré de PDB (protein data bank).

En vu de mieux caractériser la protéine issue du gène *xerD*, on a effectué un clonage du gène dans le vecteur plasmidique pQE31 (QIAGEN). Ceci permet XerD d'avoir une queue composée de six histidines en N-terminale, ainsi aidant dans la purification de la protéine sans pour autant affecter les capacités de liaison et clivage de cette protéine. Les résultats de la protéine purifiée sont mis en évidence dans la Figure 13.

En parallèle, l'amplification du gène *xerC* de *S. aureus* été effectué avec succès. Cependant, en essayant de faire le clonage de ce dernier dans un vecteur plasmidique, on n'arrivait pas à avoir un clonage efficace. En envoyant les produits de clonage pour séquençage génomique, les résultats ne démontraient pas une insertion du gène *xerC* dans le vecteur. Pour cette raison, la protéine XerC n'a pas pu être purifiée pour son utilité dans des expériences de liaison et activité de clivage.



**Figure 13.** Induction et purification de XerD de *S. aureus*. Le gel montre les échantillons des différentes étapes de la purification.

## 2. Liaison à l'ADN

Afin de résoudre de réplicons multimeriques qui se manifestent dans environ 15 % des cellules en croissance exponentielle (Steiner et Kuempel, 1998), les recombinases XerC et XerD du système de recombinaison site spécifique interviennent en se liant au site *dif* pour effectuer le clivage et la réaction de recombinaison nécessaires (Blakely et al., 1991 ; 1993). La première étape dans cette réaction consiste en la liaison de XerD au demi-site droit du site *dif* chromosomal (Blakely et Sherratt, 1994). Il s'ensuit qu'une des premières analyses de réactions de liaison était la vérification de l'activité de liaison de *S. aureus* XerD

au site *dif* d'*E. coli*. L'expérience était réalisée en utilisant le site *dif* de *E. coli* car le site *dif* de *S. aureus* n'a pas encore été cloné, bien que déjà observé.

La liaison de XerD de *S. aureus* au *dif* de *E. coli* démontre la présence de plusieurs bandes simultanément (Fig. 3, chapitre II) avec celle migrant le plus rapidement représentant un monomère de XerD lié au site *dif*, suivie des bandes représentant des monomères de XerD liés aux demi-sites spécifiques à XerC et XerD, deux monomères de XerD liés à son demi-site spécifique, puis finalement des liaisons non-spécifiques. D'après des résultats antécédents, XerD d'*E. coli* se lie en tant que monomère à son site *dif*, puis seulement une fois le site saturé commence la liaison non-coopérative d'un deuxième monomère de XerD (Blakely et al., 1993 ; Sciochetti et al., 1999). Ceci semble coïncider avec les résultats obtenus avec *S. aureus* XerD et sa liaison au site *dif* d'*E. coli* malgré la divergence évolutive connue entre les bactéries Gram-positives et Gram-négatives. À de faibles concentrations, on observe seulement la formation d'une bande et au fur et à mesure que les concentrations de la recombinase augmentent, une saturation eue lie, donnant place à l'apparition de plusieurs bandes. Finalement, à de très grandes concentrations de protéine, les demi-sites *dif* tous saturés, des liaisons non-spécifiques commencent à se manifester.

Plus spécifiquement, la formation de la première bande, le complexe d'un monomère de XerD lié au site *dif* d'*E. coli*, se fait à une concentration assez faible, soit 29 nM. Ceci démontre une assez bonne affinité pour le site *dif* d'*E. coli* malgré le fait que ce dernier ne soit pas le substrat naturel de *S. aureus* XerD et que la quantité de *E. coli* XerD requise pour une bonne liaison reste plus basse (12,5 nM) (Spiers et Sherratt, 1999). On peut expliquer ceci de deux façons ; soit les sites *dif* d'*E. coli* et *S. aureus* sont très semblables (Fig.2, chapitre II) favorisant ainsi une bonne liaison de *S. aureus* XerD, soit les protéines XerD chez *S. aureus* et *E. coli* eux-mêmes sont assez similaires pour permettre une bonne spécificité de liaison au site de recombinaison. Comme confirmation de la liaison, il est à noter qu'aucun complexe n'était formé en utilisant un contrôle négatif d'ADN marqué non-spécifique.

Avec cette expérience, on peut affirmer la liaison de *S. aureus* XerD au site *dif* chromosomal. Comme le site *dif* de *S. aureus* ne peut être utilisé pour des analyses de formation de complexe ADN-protéine, on ne peut pas tirer des conclusions sur la nature exacte de l'activité de liaison de XerD à son substrat naturel chez *S. aureus*. Cependant, nous sommes capables de spéculer que la liaison de la recombinase serait similaire à ce qu'on observe en utilisant le site *dif* d'*E. coli*.

### 3. Liaison coopérative

Sachant que le système de recombinaison chez plusieurs bactéries, incluant celui de *S. aureus*, requièrent la présence de deux recombinases, XerC et XerD, il est important de comprendre l'interaction qui a lieu entre ces deux protéines et comment ces interactions affectent la réaction de recombinaison site-spécifique. D'après nos résultats, on peut conclure que la liaison au site *dif* est de nature coopérative. Avec la liaison de XerD au site *dif*, il a eu un changement dans la conformation de l'ADN, ce qui facilite la liaison subséquente de la recombinase XerC via des interactions spécifiques entre les deux recombinases. Plus spécifiquement, chez *E. coli*, il était montré précédemment que ce sont les interactions entre les régions C-terminales de XerC et XerD qui sont impliquées dans le déroulement des réactions normales de recombinaison (Spiers et Sherratt, 1999).

La figure 5 (chapitre II), montre la formation d'un complexe de XerC d'*E. coli* et XerD de *S. aureus* liés au site *dif* d'*E. coli*. Ceci démontre que la recombinase XerD de *S. aureus*, une bactérie Gram-positif, est capable de se lier de façon coopérative et d'interagir avec un site de recombinaison et une recombinase d'une bactérie Gram-négative. Cependant, il faut noter qu'à cause de l'utilisation d'un substrat qui n'est pas naturel pour la protéine XerD de *S. aureus*, la quantité de XerD requise afin d'obtenir un complexe représentant une liaison coopérative est plus grande que la quantité de XerD d'*E. coli* nécessaire pour former ce même



genre de complexe sur son substrat naturel, soit *dif* d'*E. coli*. Comme montre la figure 4, XerD d'*E. coli* permet la formation du complexe Ecdif-EcXerD-EcXerC à une concentration de 7 nM, tandis qu'une concentration de 29 nM de XerD de *S. aureus* est nécessaire pour le complexe Ecdif-SaXerD-EcXerC (figure 5, chapitre II). En vu de vérifier la composition des bandes formées suite a la migration, il serait intéressant d'effectuer une détection de type Western contre la MBP, EcXerC étant couplé à la MBP, et contre le His-Tag, SaXerD étant couplé à un His-Tag. De cette façon, on pourrait s'assurer que la bande formée en présence d'EcXerC et SaXerD sur le site *dif* d'*E. coli* non-présente quand les recombinaisons liés au site *dif* sont migrés individuellement est enfaite due à la liaison coopérative des deux recombinaisons simultanément.

En ce qui concerne la coopérativité entre XerD de *S. aureus* et XerC de *C. crescentus* au site *dif* d'*E. coli*, la figure 7 (chapitre II) démontre assez clairement que la coopérativité entre ces deux recombinaisons est absente. Il n'existe pas de bande supplémentaire de haute taille formée quand les deux recombinaisons sont incubés ensemble qui n'est pas présente lorsqu'on incube les recombinaisons seuls avec le site *dif* d'*E. coli*. Malgré le fait qu'il était déjà montré que XerC de *C. crescentus* est capable de se lier au site *dif* d'*E. coli* tout seul et aussi de façon coopérative avec son XerD correspondante de *C. crescentus* (Jouan et Szatmari, 2003), nous n'avons pas pu obtenir cette même interaction avec le XerD de *S. aureus*. L'affinité

des protéines XerC de *C. crescentus* ou XerD de *S. aureus* avec le site *dif* d'*E. coli* ne peut pas être attribuée au problème car on voit bien qu'un complexe stable se forme avec le site *dif* en incubant les protéines individuellement (figures 3 et 6, chapitre II). Il se peut alors que les interactions entre ces deux protéines soient simplement trop faibles pour générer un complexe stable au site *dif*.

#### 4. Complémentation

Les souches bactériennes qui n'arrivent pas à résoudre les dimères chromosomiques développent une filamentation dans environ 15 % des cellules (Kuempel et al., 1991), présentent une morphologie anormale des nucleoïdes, subissent une induction de la réponse SOS, et ont un taux de croissance réduit comparées avec des cellules sauvages (Kuempel et al., 1991 ; Cornet et al., 1996).

Avec une souche d'*E. coli* DS9008 mutant pour la recombinase XerD, une protéine nécessaire au bon fonctionnement du système de résolution XerCD, on observe une filamentation assez évidente (figure 8a, chapitre II). Le plasmide (pQE31) contenant un clone de la protéine XerD de *S. aureus* était introduit après isolation dans la souche d'*E. coli* DS9008. On observe une réduction dans la filamentation une fois ce plasmide introduit (figure 8a, chapitre II), impliquant une complémentation de la protéine mutante par la protéine XerD de *S. aureus*. Ceci suggère que les

deux recombinases XerD des deux bactéries différentes soient interchangeables en ce qui concerne la réaction de la recombinaison et indique que XerD de *S. aureus* travaille en concordance avec la recombinase XerC et les autres protéines, telle que FtsK, nécessaires pour la recombinaison chez *E. coli*. La Figure 14 nous montre la région de XerD chez *E. coli* importante pour l'interaction avec FtsK (acides aminés 282 à 293) (Yates et al. 2006) et sa similarité avec la même région chez *S. aureus*, ainsi démontrant la possibilité d'interchangeabilité des recombinases de ces deux bactéries. On peut aussi confirmer, comme vérifié précédemment avec la liaison de la protéine au site *dif* d'*E. coli* (figure 3, chapitre II), que XerD se lie de façon efficace au site *dif* d'*E. coli*.

L'expérience faite parallèlement avec la souche d'*E. coli* DS9008 pCS210 donne des résultats différents. En transformant le même plasmide contenant la protéine sauvage de XerD de *S. aureus* dans cette souche, contenant deux sites de recombinaison *cer*, on n'assiste pas à une complémentation de *xerD* muté. La figure 8b (chapitre II) démontre que la recombinaison aux sites *cer* n'est pas efficace même en présence d'une protéine fonctionnelle de *S. aureus*. On peut conclure que la recombinase XerD de *S. aureus* n'arrive pas à se lier aux sites *cer* de recombinaison plasmidique comme était le cas pour la recombinaison au site *dif* chromosomique. Le fait que cette protéine ne soit pas efficace dans la recombinaison plasmidique peut être aussi attribué à un manque de

compatibilité avec les protéines accessoires nécessaires pour la recombinaison de type plasmidique. On voit que XerD de *S. aureus* ne peut pas compléter la recombinaise *xerD* mutée dans cette souche d'*E. coli*, se manifestant par l'absence de la bande représentant la forme recombinée, soit pCS211, dans les puits contenant la souche *E. coli* DS9008 pCS210 transformée avec le plasmide pQE31 contenant le clone de XerD de *S. aureus* (figure 8b, chapitre II). Il serait intéressant de confirmer ce manque de complémentation en observant les phénotypes de filamentation en utilisant un microscope à fluorescence comme ce qui a été fait pour le test de complémentation de recombinaison chromosomique avec la souche *E. coli* DS9008.

```

          10
Ecxerd RLRQLHQHHPRA
      ..:.....: ::::
Saxerd QIRKMYNQFHPRA
          10

```

**Figure 14 :** Alignement des acides aminés de la protéine XerD de *E. coli* et *S. aureus* dans la région d'interaction avec FtsK (acides aminés 282 à 293). L'alignement était fait utilisant le programme LALIGN. [http://www.ch.embnet.org/software/LALIGN\\_form.html](http://www.ch.embnet.org/software/LALIGN_form.html) Les lignes verticales (|) représentent l'identité; (:.) représente un haut taux de similarité; et des points simples (.) représentent moins de similarité entre les acides aminés. Dans cette région de XerD, il y a une identité de 46.2 % entre les protéines.

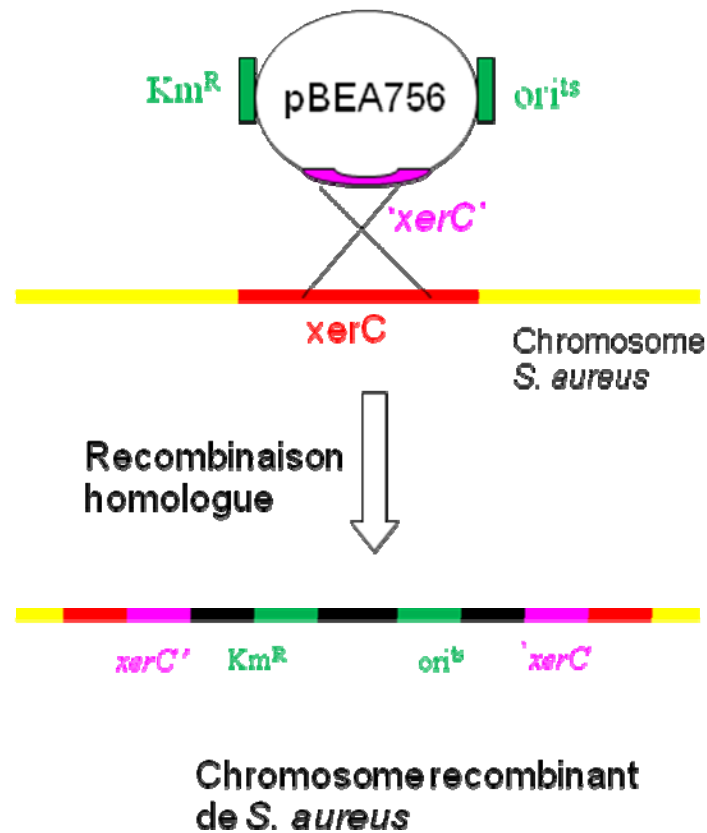
## 5. Autres Expériences

À part les expériences décrites dans l'article, nous avons commencé d'autres études avec XerC et XerD de *S. aureus*. Ces expériences visaient à mieux caractériser les rôles spécifiques de ces protéines dans la réaction de recombinaison chez *S. aureus*.

Tout d'abord, nous avons essayé de cloner la recombinase XerC dans un vecteur plasmidique afin d'exprimer et d'isoler cette protéine pour des tests de liaison à l'ADN et d'autres protéines impliquées dans la réaction de recombinaison site-spécifique comme était fait pour XerD de *S. aureus*. Cependant, après amplification par PCR, le clonage dans un plasmide ne donnait jamais des résultats assez concluants permettant de continuer avec l'isolation de la protéine XerC. Après amplification, la méthode consistant en le clonage du gène doit être mise au point afin de réussir à avoir des résultats concluants. La même chose était faite avec le site *dif* de *S. aureus*, mais après amplification par PCR, on était arrêté par un clonage inefficace dans le plasmide pUC19. Étant donné la petite taille du site *dif*, une autre option possible serait de le faire synthétiser (synthèse d'oligonucléotide) sans devoir passer par une amplification par PCR. Ceci éliminerait le besoin d'utiliser des amorces initiales d'ADN.

D'une autre part, nous avons aussi commencé à faire des mutations d'insertion des gènes *xerC* et *xerD* de *S. aureus*. Encore une fois, dès que les mutants des gènes étaient amplifiés, les clonages de ces mutants

d'insertion dans le vecteur plasmidique, pBEA756, n'étaient pas concluants. Dans ce cas, il serait aussi possible d'avoir recours à la synthèse d'oligonucléotides afin de créer les mutants. Normalement, une fois les régions internes amplifiées et clonées dans un plasmide contenant une origine de répllication conditionnelle, ces mutants auraient été transformés directement dans *S. aureus*. Une sélection d'abord à la température permissive suivi d'une sélection à la température non-permissive avec une antibiotique (pour maintenir une sélection) permettrait ensuite de sélectionner une intégration par recombinaison homologue qui inactive Xer (Figure 15). Si les insertions dans *xerD* se montraient léthales pour les cellules, on prévoyait cloner des mutants de *xerD*, tel qu'un mutant de site actif tyrosine, dans un plasmide de *S. aureus* ayant un promoteur réglable, afin d'observer les conséquences de la surexpression du mutant.



**Figure 15 :** Construction de mutants d'insertion. Exemple du mutant  $xerC$ .

## 6. Perspectives

Dans ce papier, les expériences complétées avec la recombinaise XerD nous mènent à croire que cette protéine est efficace dans la réaction de recombinaison pour la résolution des chromosomes multimeriques ainsi assurant la bonne ségrégation de l'ADN lors de la division cellulaire. Nous n'avons pas seulement observé sa liaison au site *dif* d'*E. coli* mais aussi sa coopérativité avec la recombinaise XerC d'*E. coli* et sa capacité de

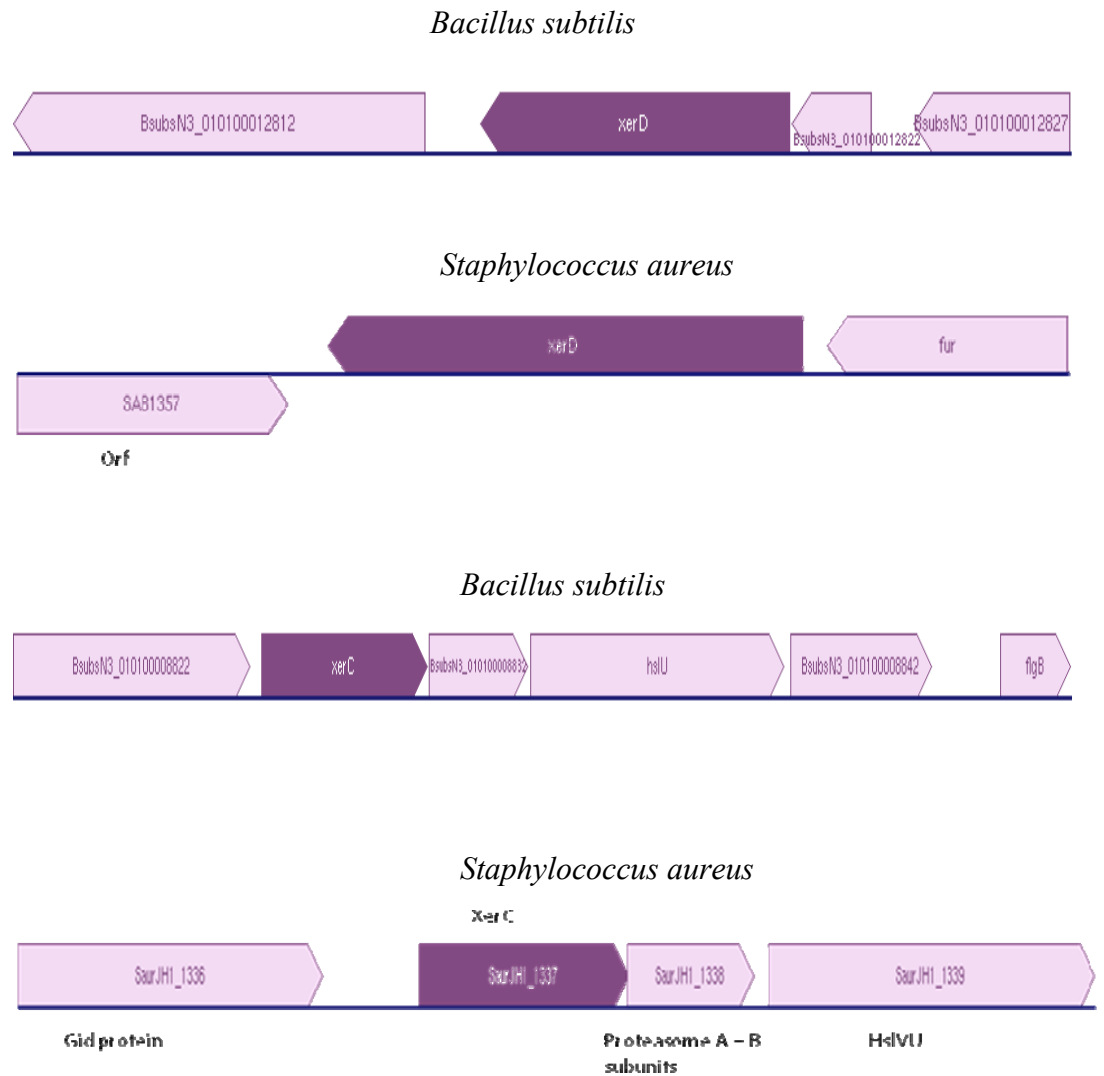
complémentation de XerD d'*E.coli* pour le bon déroulement dans la recombinaison site-spécifique au site de recombinaison chromosomique. Par ailleurs, il reste des expériences à faire afin de mieux caractériser cette recombinaison et la réaction de recombinaison spécifique à *S. aureus*.

En premier lieu, il est nécessaire de pouvoir cloner et caractériser XerC et le site *dif* de *S. aureus* avant de compléter la caractérisation des recombinaisons. Après que ceci soit accompli, des tests de capacité de clivage des deux recombinaisons (en utilisant des substrats suicides) et de coopérativité entre ces protéines seraient utiles à effectuer. Une fois XerC et XerD caractérisés, les mutants pourraient être analysés afin d'observer l'effet sur la vitesse de croissance et l'efficacité de la ségrégation de l'ADN chromosomale. Il serait intéressant de voir des mutants d'insertion de *xerC* et *xerD* en clonant des régions internes de ces gènes dans un vecteur plasmidique gram positif- thermosensible, suivi d'une transformation dans *S. aureus* et en sélectionnant pour des mutants d'insertion par une croissance à la température non-permissive. Les insertions seraient caractérisées par Southern blotting et par PCR. Les mutants seraient aussi analysés pour un taux de croissance réduite, et par microscopie à fluorescence afin de visualiser la ségrégation d'ADN chromosomique.

En outre, en identifiant des régions spécifiques des recombinaisons importantes pour la liaison à l'ADN et les sites de clivage de XerC et XerD, on arriverait à mieux comprendre le déroulement de la réaction chez cette



bactérie en plus des expériences vérifiant la recombinaison *in vivo*. D'un grand intérêt seraient des expériences visant à identifier les résidus de XerD importants pour la viabilité associée avec XerD sauvage, ce qui mènerait à la possibilité de découvrir de nouvelles cibles à attaquer dans le développement de nouvelles thérapies antibactériennes. En adressant toutes ces expériences on pourrait commencer à identifier l'importance du système Xer chez *S. aureus*. De plus, en continuant d'effectuer des comparaisons entre les systèmes Xer de *S. aureus* et d'autres bactéries, incluant *E. coli*, on peut mieux comprendre son fonctionnement. En regardant les similarités avec le système de *Bacillus subtilis*, une bactérie Gram positive tout comme *S. aureus*, on peut s'en servir de ce qui est déjà connu sur cette bactérie afin de bâtir des expériences et tirer des conclusions sur les recombinases XerC et XerD de *S. aureus*. La comparaison du génome des deux bactéries nous montre que les gènes en amont et en aval de ces deux recombinases sont très semblables ; les recombinases XerC ayant le gène codant la topoisomerase I en aval et le gène codant la protéine HsIVU en amont et les recombinases XerD ayant tous les deux une protéine de régulation de fer codée en aval (Figure 16). Ce fait donne la possibilité de continuer des expériences en utilisant les recombinases et/ou le site *dif* de *B. subtilis* afin d'arriver à mieux amorcer les activités et fonctionnement du système Xer chez *S. aureus*.



**Figure 16:** Contexte des gènes codant les recombinases XerC et XerD chez *B. subtilis* et *S. aureus*. Les images étaient tirées de BioCyc ([www.biocyc.org](http://www.biocyc.org)).



## References

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

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

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

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

Argos, P., Landy, A., Abremski, K., Egan, J.B., Haggard-Ljungquist, E., Hoess, R.H., Kahn, M.L., Kalionis, B., Narayana, S., Pierson, L.S., Sternberg, N., and Leong, J.M. (1986). The integrase family of site-specific recombinases: regional similarities and global diversity. *EMBO J.*, 5, 433-440.

Aussel, L., Barre, F.X., Aroyo, M., Stasiak, A., Stasiak, A.Z., and Sherratt, D.J. (2002). FtsK is a DNA motor protein that activates chromosome dimer resolution by switching the catalytic state of the XerC and XerD recombinases. *Cell*, 108, 195-205.

Austin, S., Ziese, M., and Sternberg, N. (1981). A novel role for site-specific recombination in maintenance of bacterial replicons. *Cell*. 25 (3), 729-36.

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

Bigot, S., Corre, J., Louarn, J.-M., Cornet, F., and Barre, F.-X. (2004). FtsK activities in Xer recombination, DNA mobilization and cell division involve overlapping and separate domains of the protein. *Mol Microbiol.*, 54, 876-886.

Bigot, S., Saleh, O.A., Lesterlin, C., Pages, C., Karoui, M.E., Dennis, C., Grigoriev, M., Allemand, J.F., Barre, J.F., and Cornet, F. (2005). KOPS: DNA motifs that control *E. coli* chromosome segregation by orienting the FtsK translocase. *EMBO J.*, 24, 3370-3780.

Bigot, S., Saleh, O.A., Cornet, F., Allemand, J.F., and Barre, F.X. (2006). Oriented loading of FtsK on KOPS. *Nat Struct Mol Biol.*, 13, 1026–1028.

Bigot, S., Sivanathan, V., Possoz, C., Barre F. X. and Cornet, F. (2007). FtsK, a literate chromosome segregation machine. *Mol Microbiol.*, 64, 1434-1441.

Biller, S.J. and Burkholder, W.F. (2009). The *Bacillus subtilis* SftA (YtpS) and SpoIIIE DNA translocases play distinct roles in growing cells to ensure faithful chromosome partitioning. *Mol. Microbiol.* 74, 790-809.

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

Blakey G.W., Davidson A.O, and Sherratt, D.J. (2000). Sequential strand exchange by XerC and XerD during site-specific recombination at *dif*. J. Biol Chem., 275, 9930-9936.

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

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

Blakely, G.W., and Sherratt, D.J. (1996). Cis and trans in site-specific recombination. Mol. Microbiol. 20, 233-238.

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

Bonné, L., Bigot, S., Chevalier, F., Allemand, J.F., and Barre, F.X. (2009). Assymmetric DNA requirements in Xer recombination activation by FtsK. Nucleic Acids Res. 37 (7), 2371-2380.

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

Brukner, R.C. and Cox, M.M. (1986). Specific contacts between the FLP protein of the yeast 2-micron plasmid and its recombination site. *J Biol Chem.* 261 (125), 11798-807.

Camerini-Otero, R.D., Hsieh, P. (1995). Homologous recombination proteins in prokaryotes and eukaryotes. *Annu Rev. Genet.*, 29, 509-52.

Cao, Y. and Hayes, F. (1999). A newly identified, essential catalytic residue in a critical secondary structure element in the integrase family of site-specific recombinases is conserved in a similar element in eukaryotic type IB topoisomerases. *J Mol Biol.* 274, 39-53.

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

Capiaux, H., Lesterlin, C., Pérals, K., Louarn, J.M., and Cornet, F. (2002). A dual role for the FtsK protein in *Escherichia coli* chromosome segregation. *EMBO Rep.*, 3, 532–536.

Carnoy, C., and Roten, C.A. (2009). The *diff*/Xer Recombination Systems in Proteobacteria. *PLoS One.* 4, e6531.

Chalker, A.F., Lupas, A., Ingraham, K., So, C.Y., Lunsford, R.D., Li, T., Bryant, A., Holmes, D.J., Marra, A., Pearson, S.C., Ray, J., Burnham, M.K.R., Palmer, L.M., Biswas, S., and Zalacain, M. (2000). Genetic Characterization of Gram-Positive Homologs of the XerCD Site-Specific Recombinases. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.*, 2 (2), 225-233.

- Chen, J.C., and Beckwith, J. (2001). FtsQ, FtsL, and FtsI require FtsK, but not FtsN, for co-localization during *Escherichia coli* cell division. *Mol Microbiol.* 42 (2), 395-413.
- Chen, Y., Narendra, U., Iype, L.E., Cox, M.M., and Rice, P.A. (2000) Crystal structure of a Flp recombinase-Holliday junction complex: assembly of an active oligomer by helix swapping. *Mol Cell.*, 6, 885–897.
- Cheng, C., Kussie, P., Pavletich, N. and Shuman, S. (1998). Conservation of structure and mechanism between eukaryotic topoisomerase I and site-specific recombinases. *Cell.* 92, 841-850.
- Colloms, S.D., McCulloch, R., Grant, K., Neilson, L., and Sherratt, D.J. (1996). Xer-mediated site-specific recombination *in vitro*. *EMBO J.* 15, 1172-1181.
- Cornet, F., Hallet, B., and Sherratt, D.J. (1997). Xer recombination in *Escherichia coli*: site-specific DNA topoisomerase activity of the XerC and XerD recombinases. *J. Biol Chem.* 272, 21927-21931.
- Cornet, F., Louarn, J., Patte, J., and Louarn, J.M. (1996). Restriction of the activity of the recombination site *dif* to a small zone of the *Escherichia coli* chromosome. *Genes Dev.*, 10, 1152–1161.
- Cornet, F., Mortier, I., Patte, J., and Louarn, J.M. (1994). Plasmid pSC101 harbors a recombination site, *psi*, which is able to resolve plasmid multimers and to substitute for the analogous chromosomal *Escherichia coli* site *dif*. *J. Bacteriol.*, 176, 6973-6980.



Corre, J., and Louarn, J.M. (2002). Evidence from terminal recombination gradients that FtsK uses replichore polarity to control chromosome terminus positioning at division in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.*, 184 (14), 3801-7.

Cortez, D., Quevillon-Cheruel, S., Gribaldo, S., Desnoues, N., Sezonov, G., Forterre, P., and Serre, M.C. (2010). Evidence for a Xer/dif system for chromosome resolution in archaea. *PLoS Genet.*, 6 (10): e1001166.

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

Craig, N.L. (1988). The mechanism of conservative site-specific recombination. *Annu Rev Genet*, 22, 77-105.

Cromie, G.A., and Leach, D.R. (2000). Control of crossing over. *Mol Cell*, 6, 815-826.

David, M.Z., Daum, R.S. (2010). Community-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: Epidemiology and Clinical Consequences of an Emerging Epidemic. *Clin Microbiol. Rev.*, 23 (3), 616-87.

De Massy, B., Béjar S., Louarn, J., Louarn, J.M., and Bouché, J.P. (1987). Inhibition of replication forks exiting the terminus region of the *E.coli* chromosome occurs at two loci separated by 5 min. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 84, 1758-1763.

Dhar, G., McLean, M.M., Heiss, J.K., and Johnson, R.C. (2009). The Hin recombinase assembles a tetrameric protein swivel that exchanges DNA strands. *Nucleic Acids Res.*, 37 (14), 4743-56.

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

Dorazi, R., and Dewar, S.J. (2000). Membrane topology of the N-terminus of the *Escherichia coli* FtsK division protein. *FEBS Lett.*, 478, 13–18.

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

Dubarry, N., Possoz, C., and Barre, F.X. (2010). Multiple regions along the *Escherichia coli* FtsK protein are implicated in cell division. *Mol Microbiol.* 78 (5), 1088-100. doi: 10.1111/j.1365-2958.

Erickson, M.J. and Meyer, R.J. (1993). The origin of greater-than-unit length plasmids generated during bacterial conjugation. *Mol. Microbiol.*, 7, 289-298.

Esposito, D. and Scocca, J.J. (1997). The integrase family of tyrosine recombinases: evolution of a conserved active site domain. *Nucleic Acids Res.*, 25, 3605-3614.

Gennaro, M.L., Kornblum, J., Novick, R.P. (1987). A site-specific recombination function in *Staphylococcus aureus* plasmids. J. Bacteriol., 169 (6), 2601-10.

Gopaul, D.N., and Van Duyne G.D. (1999). Structure and mechanism in site-specific recombination. Curr. Opin. Struct. Biol., 9, 14-20.

Graham, J.E., Sherratt, D.J., and Szczelkun, M.D. (2010a). Sequence-specific assembly of FtsK hexamers establishes directional translocation on DNA. Proc. Natl Acad. Sci. USA. 107, 20263-20268.

Graham, J.E., Sivanathan, V., Sherratt, D.J., and Arciszewska, L.K. (2010b). FtsK translocation on DNA stops at XerCD-*dif*. Nucleic Acids Res. 38, 72-81.

Grainge, I., Bregu, M., Vazquez, M., Sivanathan, V., Ip, S.C., and Sherratt, D.J. (2007). Unlinking chromosome catenanes *in vivo* by site-specific recombination. EMBO J. 26 (19), 4228-38.

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

Grainge, I., Lesterlin, C., and Sherratt, D.J. (2011). Activation of XerCD-*dif* recombination by the FtsK DNA translocase. Nucleic Acids Res. 39 (12), 5140-8.

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

Hakkaart, M.J., van den Elzen, P.J., Veltkamp, E., and Nijkamp, H.J. (1984). Maintenance of multicopy plasmid Clo DF13 in *E. coli* cells : evidence for site-specific recombination at parB. *Cell.*, 36 (1), 203-9.

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

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

Hatfull, G. F., and Grindley, N.D.F. (1988). Resolvases and DNA-invertases: a family of enzymes active in site-specific recombination. In: *Genetic Recombination* (Kucherlapati, R. and Smith, G., Eds.), 357-396. American Society for Microbiology, Washington, DC.

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

Hendrickson, H. and Lawrence, J.G. (2007). Mutational bias suggests that replication termination occurs near the *dif* site, not at *Ter* sites. *Mol Microbiol.* 64, 42-56.

Hoess, R., Wierzbicki, A., and Abremski, K. (1985). Formation of small circular DNA molecules via an *in vitro* site-specific recombination system. *Gene.* 40 (2-3), 325-329.

Hoess, R.H., Wiezbicki, A. and Abremski, K. (1986). The role of the *loxP* spacer region in P1 site-specific recombination. *Nucleic Acids Res.*, 14, 2287-2301.

Iyer, L.M., Markarova, K.S., Koonin, E.V., and Aravind, L. (2004). Comparative genomics of the FtsK-HerA superfamily of pumping ATPases; implication for the origins of chromosome segregation, cell division and viral capsid packaging. *Nucleic Acids Res.* 32, 5260-5279.

Ip, S.C., Bregu, Y., Barre, F.X., and Sherratt, D.J. (2003). Decatenation of DNA circles by FtsK-dependent Xer site-specific recombination. *EMBO J.* 22, 6399-6407.

Jouan, L., and Szatmari, G. (2003). Interaction of the *Caulobacter crescentus* XerC and XerD recombinases with the *E.coli dif* site. *FEMS Microbiol Lett.*, 222, 257-262.

Kennedy, S.P., Chevalier, F., and Barre, F.X. (2008). Delayed activation of Xer recombination at *dif* by FtsK during septum assembly in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.*, 68, 1018–1028.

Kluytmans J., van Belkum A., Verbrugh H. (1997). Nasal carriage of *Staphylococcus aureus*: epidemiology, underlying mechanisms, and associated risks. *Clin. Microbiol. Rev.*, 10 (3), 505-20. Doi:10.1016/S00063207(03)001460.PMC 172932. PMID 9227864.

Kolb, A. F. (2002). Genome engineering using site-specific recombinases. *Cloning Stem Cells*, 4, 65-80.

Kono, N., Arakawa, K., and Tomita, M. (2011). Comprehensive prediction of chromosome dimer resolution sites in bacterial genomes. *BMC Genomics*. 12, 19.

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

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

Kuzminov, A. (1995). Collapse and repair of replication forks in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol*. 16, 373-384.

Kuzminov, A. (1981). Recombinational repair of DNA damage in *Escherichia coli* and bacteriophage lambda. *Microbiol Mol Biol Rev.*,63 (4), 751-813.

Landy, A. (1989). Dynamic, structural, and regulatory aspects of lambda site-specific recombination. *Annu Rev Biochem*. 58, 913-949..

Le Bougeois, P., Bugarel, M., Campo, N., Daveran-Mingot, M.L., Labonté, J., *et al.*, (2007). The unconventional Xer recombination machinery of *Streptococci/Lactococci*. *Plos Genet* 3(7):e117. Doi : 10.1371/journal.pgen.0030117.

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

Lesterlin, C., Barre, F.X., and Cornet, F. (2004). Genetic recombination and the cell cycle: what we have learned from chromosome dimmers. Mol. Microbiol. 54, 1151-1160.

Levy, O., Ptach, J., Pease, P., Gore, J., Eisen, M.B., and Bustamante, C. (2005). Identification of oligonucleotide sequences that direct the movement of the *Escherichia coli* FtsK translocase. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 102, 17618-17623.

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

Lohman, T.M., Tomko, E.J., and Wu, C.G. (2008). Non-hexameric DNA helicases and translocases : mechanisms and regulation. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 9, 391-401.

Lovett, S.T., and Kolodner, R.D. (1991). Nucleotide sequence of the *Escherichia coli* *recJ* chromosomal region and construction of RecJ-overexpression plasmids. J. Bacteriol. 173, 363-364.

Lowe, J., Ellonen, A., Allen, M. D. Atkinson, C., Sherratt, D.J., and Grainge, I. (2008). Molecular mechanism of sequence-directed DNA loading and translocation by FtsK. Mol Cell, 31, 498-509.

Lusser, A. and Kadonaga, J.T. (2003). Chromatin remodeling by ATP-dependent molecular machines. *Bioessays*. 25 (12), 1192-200.

Massey, T.H., Mercogliano, C.P., Yates, J., Sherratt, D.J., and Lowe, J. (2006). Double-stranded DNA translocation: structure and mechanism of hexameric FtsK. *Mol Cell*. 23, 457–469.

Michel, B., Recchia, G.D., Penel-Colin, M., Ehrlich, S.D., and Sherratt, D.J. (2000). Resolution of Holliday junctions by RuvABC prevents dimer formation in *rep* mutants and UV irradiated cells. *Mol Microbiol*. 37, 181–191.

Missiakas, D., Georgopoulos, C. and Raina, S. (1994). The *Escherichia coli dsbC (xprA)* gene encodes a periplasmic protein involved in disulfide bond formation. *EMBO J.*, 13, 2013-2020.

Moldave, K. (2005). *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology*. San Diego: Elsevier Academic Press. p. 4.

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

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



Novick, R.P., Iordanescu, S., Surdeanu, M., and Edelman, I. (1981). Transduction-related cointegrate formation between staphylococcal plasmids: A new type of site-specific recombination. *Plasmid*. 6, 159-72.

Nunes-Düby S.E., Azaro M.A., and Landy A. (1995). Swapping DNA strands and sensing homology without branch migration in lambda site-specific recombination. *Curr Biol*. 5,139-148.

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

Pease, P.J., Levy, O., Cost, G, J., Gore, J., Ptacin, J.L., Sherratt, D.J., Bustamante, C., and Cozzarelli, N.R. (2005). Sequence-directed DNA translocation by purified FtsK. *Science*, 307, 586–590.

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

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

Pichoff, S. and Lutkenhaus, J. (2002). Unique and overlapping roles for ZipA and FtsA in septal ring assembly in *Escherichia coli*. *EMBO J*. 21 (4), 685-93.

Poulter, R.T. and Goodwin, T.J., (2005). DIRS-1 and the other tyrosine recombinase retrotransposons. *Cytogenet Genome Res.* 110 (1-4), 575-88.

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

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

Rocha, E.P.C., Cornet, E., and Michel, B. (2005). Comparative and evolutionary analysis of the bacterial homologous recombination systems. *PLoS Genetics.*, 1(2):e15.

Rowland, S.J., Stark, W.M., and Boocock, M.R. (2002). Sin recombinase from *Staphylococcus aureus*: synaptic complex architecture and transposon targeting. *Mol. Microbiol.* 44, 607-619.

Sadowski, P.D. (1995). The Flp recombinase of the 2 $\mu$ m plasmid of *Saccharomyces cerevisiae*. *Prog Nucleic Acid Res. Mol Biol.* 51, 53-91.

Saleh, O.A., Peral, C., Barre, F.X., and Allemand, J.F. (2004). Fast, DNA-sequence independent translocation by FtsK in a single-molecule experiment. *EMBO J.* 23, 2430-2439.

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

Sarkis, G.J., Murley, L.L., Leschziner, A.E., Boocock, M.R., Stark, W.M., and Grindley, N.D. (2001). A model for the gamma delta resolvase synaptic complex. *Mol. Cell.*, 8(3), 623-31.

Sauer, B. (1998). Inducible gene targeting in mice using the Cre/lox system. *Methods: a Companion Methods Enzymol.* 14, 381-392.

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

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

Sherratt, D.J. (1993). Site-specific recombination and the segregation of circular chromosomes. *Nucleic Acids Mol. Biol.*, 7, 202-216.

Sherratt, D.J., Arciszewska, L.K., Blakely, G., Colloms, S., Grant, K., Leslie, N., and McCulloch, R. (1995). Site-specific recombination and circular chromosome segregation. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 347, 37-42.

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

- Sherratt, D.J., and Wigley, D.B. (1998). Conserved themes but novel activities in recombinases and topoisomerases. *Cell*, 93, 149–152.
- Sivanthan, V., Allen, M.D., de Bekker, C., Baker, R., Arciszewska, L.K., Freund, S.M., Bycroft, M., Löwe, J., and Sherratt, D.J. (2006). The FtsK gamma domain directs oriented DNA translocation by interacting with KOPS. *Nat Struct Mol Biol*. 13 (11), 965-72.
- Sivanathan, V., Emerson, J.E., Pages, C., Cornet, F., Sherratt, D.J., and Arciszewska, L.K. (2009). KOPS-guided DNA translocation by FtsK safeguards *Escherichia coli* chromosome segregation. *Mol Microbiol*. 71 (4), 1031-42.
- Smith, M.C., and Thorpe, H.M. (2002). Diversity in the serine recombinases. *Mol. Microbiol*. 44, 299-307.
- Spiers, A.J., and Sherratt, D. J. (1997). Relating primary structure to function in the *Escherichia coli* XerD site-specific recombinase. *Mol. Microbiol*. 24, 1071-1082.
- Spiers, A. J., and Sherratt, D. J. (1999). C-terminal interactions between the XerC and XerD site-specific recombinases. *Mol. Microbiol*. 32, 1031-1042.
- Stark, W.M, Boocock, M.R. (1995). Topological selectivity in site-specific recombination. *Mobile Genetic Elements*, Oxford University Press, pp. 101–29.
- Stark, W.M., Boocock, M.R., and Sherratt, D.J. (1992). Catalysis by site-specific recombinases. *Trends Genet*. 8, 432-439.

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

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

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

Sträter, N., Sherratt, D.J., and Colloms, S.D. (1999). X-ray structure of aminopeptidase A from *Escherichia coli* and a model for the nucleoprotein complex in Xer site-specific recombination. *EMBO J.* 18, 4513-22.

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

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

Summers, D.K., and Sherratt, D.J. (1988). Resolution of ColE1 dimers requires a DNA sequence implicated in the three-dimensional organization of the *cer* site. *EMBO J.* 7, 851-858.

Summers, D.K. (1989). Derivatives of ColE1 *cer* show altered topological specificity in site-specific recombination. *EMBO J.* 8, 309-315.

Tecklenburg, M., Naumer, A., Nagappan, O., and Kuempel, P. (1995). 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. USA.* 92, 1352–1356.

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

Van Gool, A.J., Hajibagheri, N.M., Stasiak, A., and West, S.C. (1999). Assembly of the *Escherichia coli* RuvABC resolvosome directs the orientation of Holliday junction resolution. *Genes Dev.* 13, 1861–1870.

Villion, M, and Szatmari, G. (2003). The XerC recombinase of *Proteus mirabilis*: Characterization and interaction with other tyrosine recombinases. *FEMS Microbiol Lett.* 226, 65-71.

Viollier, P.H., Thanbichler, M., McGrath, P.T., West, L., Meewan, M., McAdams, H.H., and Shapiro, L. (2004). Rapid and sequential movement of individual chromosomal loci to specific subcellular locations during bacterial DNA replication. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 101, 9257-9262.

Wang, L. and Lutkenhaus, J. (1998). FtsK is an essential cell division protein that is localized to the septum and induced as a part of the SOS response. *Mol Microbiol.* 29 (3), 731-40.

Warren, G.J., and Clark, A.J. (1980). Sequence-specific recombination of plasmid ColE1. *Proc. Natl. Acad. Sci, USA*, 77, 6724-6728.

Wu, L.J., Lewis, P.J., Allmansberger, R., Hauser, P.M., and Errington, J. (1995). A conjugation-like mechanism for prespore chromosome partitioning during sporulation in *Bacillus subtilis*. *Genes Dev.* 9, 1316-1326.

Yates, J., Aroyo, M., Sherratt, D.J., and Barre, F.X. (2003). Species specificity in the activation of Xer recombination at dif by FtsK. *Mol Microbiol.* 49, 241–249.

Yates, J., Zhekov, I., Baker, R., Eklund, B., Sherratt, D.J., and Arciszewska, L.K. (2006) Dissection of a functional interaction between the DNA translocase, FtsK, and the XerD recombinase. *Mol Microbiol.* 59, 1754–1766.

Yu, X.C., Tran, A.H., Sun, Q., and Margolin, W. (1998). Localization of cell division protein FtsK to the *Escherichia coli* septum and identification of a potential N-terminal targeting domain. *J Bacteriol.* 180, 1296–1304.

## Remerciements

J'aimerais tout d'abord remercier le Dr George Szatmari pour tout son encouragement, patience, et aide continue lors de mon projet de recherche. J'ai apprécié l'ambiance conductrice à la recherche et l'apprentissage qui a toujours été ressenti dans son laboratoire.

Je tiens aussi à remercier mes collègues de laboratoire, notamment Maxime Leroux, Zoulikha Rezoug, et Gina Ugaz pour leur aide et surtout leur soutien tout au long de mon séjour au laboratoire. Sans leur présence continue et appui constant, je n'aurais pas pu réussir. J'aimerais aussi remercier Valentine Usongo, membre du laboratoire de Dr Marc Drolet, pour sa bonne volonté d'aide et permission dans l'utilisation des outils présents dans son laboratoire.

Je suis aussi très reconnaissante envers Mohamed Merouane El Kaoussi, un soutien constant, qui m'a toujours poussé à bien travailler et réussir malgré les difficultés qui se sont présentées lors de mes études gradués. Et bien sur, j'aimerais remercier toute ma famille, surtout mes parents Lisa et Bruno Gustinelli, sans lesquels je n'aurais jamais pu aller si loin et qui m'ont toujours encouragé avec un support inconditionnel à faire ce qui me rend heureuse.