



Université de Montréal

# **Implication des topoisomérases de type 1A dans la réplication stable et constitutive de l'ADN**

par Makisha Martel

Département de microbiologie, infectiologie et immunologie  
Faculté de médecine

Mémoire présenté  
en vue de l'obtention du grade de M.Sc  
en microbiologie et immunologie

Août 2017

© Makisha Martel, 2017



## Résumé

La réplication normale de l'ADN chez *Escherichia coli* débute à *oriC*. Cependant, pendant la transcription, certains facteurs (*rnhA*, surenroulement négatif) peuvent favoriser la formation d'un R-loop, une structure trimérique d'ADN-ARN qui peut servir d'origine *oriK* pour la réplication stable et constitutive de l'ADN (cSDR). Des évidences génétiques suggèrent que les problèmes de croissance, de ségrégation et de filamentation du double mutant *topA topB* sont partiellement dus à la réplication cSDR. Afin de confirmer cette observation, ainsi que de comprendre le rôle régulateur des topoisomérases 1A durant la réplication dépendante des R-loops, nous avons développé une nouvelle technique permettant la détection et la mesure du cSDR *in vivo* à un niveau cellulaire. La croissance des cellules en présence de spectinomycine inhibe la réplication initiée à *oriC* sans affecter le cSDR. La synthèse d'ADN est alors mesurée par l'incorporation de l'EdU (5-ethynyl-2'-deoxyuridine), un analogue de la thymidine, au cours de la réplication de l'ADN. La détection des molécules d'EdU polymérisées dépend ensuite de leur liaison avec le fluorochrome Alexa Fluor 488 par une réaction «click-it». Le taux de fluorescence et la quantité de cellules ayant incorporé l'analogue est finalement mesuré par la cytométrie en flux. Grâce à ce protocole, nous avons pu confirmer la présence de réplication cSDR dans le mutant *topA topB*. De plus, nous avons détecté que le taux de réplication cSDR dans ce double mutant est supérieur à celui détecté dans le mutant *topA*. Ceci suggère que la délétion de *topB* amplifie les phénotypes liés au cSDR dans le mutant *topA*. Cependant, aucune réplication SDR n'a été détectée au sein du mutant *topB*, et la délétion de *topB* dans le mutant *rnhA* n'aggrave pas ses défauts comme elle le fait pour le mutant *topA*. Ceci suggère que la Topo III partage une fonction avec la Topo I dans la ségrégation des chromosomes, et que cette fonction est essentielle lorsque la cellule fait du cSDR. Ces résultats indiquent également que la Topo I est la principale Topo 1A impliquée dans la régulation des R-loops et du cSDR.

**Mots-clés :** R-loop, topoisomérase, *topA*, *topB*, *rnhA*, RNase H

## Abstract

Normal DNA replication in *Escherichia coli* begins at *oriC*. However, during transcription, certain factors (*rnhA*, negative supercoiling) may trigger the formation of an R-loop, a DNA-RNA hybrid which can serve as a primer for constitutive stable DNA replication (cSDR). Recent genetic evidence has suggested that growth, segregation and filamentation defects in the *topA topB* double mutant are partially linked to cSDR. To confirm these observations and to better understand the function of topoisomerase 1A in the regulation of R-loop-dependant replication, we developed a new technique which can detect and measure cSDR *in vivo* at the cellular level. Growing cells are first exposed to spectinomycin, which prevents them from initiating replication at *oriC*, without affecting cSDR. DNA synthesis is next measured by the incorporation of a thymidine analogue, EdU (5-ethynyl-2'-deoxyuridine). The detection of these incorporated molecules is accomplished through their interaction with the Alexa Fluor 488 dye, using a click-it reaction. The level of fluorescence is then measured by flow cytometry. Using this protocol, we were able to confirm the presence of cSDR in the *topA topB E. coli* mutant. Furthermore, we detected a higher level of cSDR in this double mutant than in the *topA* single mutant. These results suggest that *topB* suppression amplifies cSDR-related phenotypes in the *topA* mutant. However, no cSDR was detected in the *topB* mutant, and *topB* suppression in the *rnhA* mutant did not magnify its cSDR-related phenotypes. We thus propose that the topoisomerase III enzyme shares an important function with topoisomerase I in chromosome segregation, and also that this function is essential when the cell undergoes cSDR. Our results also demonstrated that Topo I is the major Topo 1A involved in R-loop and cSDR regulation.

**Keywords** : R-loop, topoisomerase, *topA*, *topB*, *rnhA*, RNase H

# Table des matières

Résumé.....	1
Abstract.....	2
Table des matières.....	3
Liste des tableaux.....	6
Liste des figures.....	7
Liste des abréviations.....	9
Chapitre 1 : Revue de littérature.....	11
Surenroulement de l'ADN.....	11
Structure de l'ADN.....	11
Topologie de l'ADN.....	12
Topoisomérases de type 1A.....	15
Structure des topoisomérases de type 1A.....	15
Topoisomérase I.....	17
Topoisomérase III.....	19
Rôles cellulaires de topoisomérases.....	21
Réplication de l'ADN.....	21
La transcription.....	29
Les R-loops.....	34
Les voies de formation des R-loops.....	35
Facteurs favorisant la formation des R-loops.....	38
Conséquences de la formation des R-loops.....	41
Réplication stable et constitutive de l'ADN (cSDR).....	43
cSDR dans une souche déficiente en RNase HI.....	44
Caractéristiques de la réplication cSDR.....	45
Techniques courantes pour étudier le cSDR.....	46
Protéines requises pour le cSDR.....	47
Modèle d'initiation de la réplication cSDR.....	51
Le cSDR et les topoisomérases de type 1A.....	52

Objectifs et hypothèses .....	53
Chapitre 2 : Article I .....	55
Contributions.....	56
Introduction.....	58
Materials and methods .....	62
Bacterial strains and plasmids.....	62
EdU incorporation and click-labeling.....	62
Flow cytometry analysis .....	63
Microscopy .....	63
Results.....	64
A flow cytometry-based procedure to detect cSDR .....	64
A <i>dnaT::aph</i> mutation reduces cSDR.....	67
cSDR in cells lacking both type 1A topoisomerase .....	68
cSDR in single <i>topA</i> , but not <i>topB</i> , mutant.....	71
Deleting <i>topB</i> has no effects on the growth, cell morphology and DNA content of an <i>rnhA</i> mutant .....	72
Discussion.....	75
A new procedure to detect cSDR.....	75
Function of topo I and topo III in cSDR.....	76
Acknowledgments.....	80
References.....	81
Chapitre 3 : Discussion .....	85
Développement d'une nouvelle technique de détection du cSDR.....	85
Fonction des topoisomérases 1A dans le cSDR.....	86
La sur-réplication du chromosome par le cSDR peut être responsable des problèmes de ségrégation chez le double mutant <i>topA topB</i> .....	88
Les topoisomérases 1A sont également impliquées dans la décaténation, indépendamment du cSDR.....	94
Conclusion .....	96
Bibliographie.....	i
Annexe I : Article publié non abordé dans ce mémoire.....	i

Contributions.....	ii
Abstract.....	iii
Introduction.....	iv
Materials and methods .....	viii
Bacterial strains and plasmids.....	viii
Supercoiling assays in crude cell extracts.....	ix
Plasmid extraction and agarose gel electrophoresis for supercoiling analysis. ....	ix
Insertional mutagenesis.....	x
EdU incorporation and click-labeling.....	x
Flow cytometry analysis .....	xi
Results.....	xii
The ATP-dependent supercoiling activity of gyrase, but not its ATP-independent supercoiling activity, is inhibited in topA rnhA null mutants.....	xii
Isolation of suppressors of the growth defect of topA rnhA null mutants.....	xvii
Characterization of suppressors affecting genes involved in replication.....	xx
Characterization of suppressors affecting genes involved nucleotide metabolism. ....	xxvi
Characterization of suppressors affecting genes involved fimbriae synthesis.....	xxix
cSDR activity in a topA rnhA null strain.....	xxxiv
The complementation of the growth defect of topA rnhA null mutants by overproducing topo III. ....	xxxvi
Discussion.....	xxxvii
Supplementary figures .....	xlii
Acknowledgments.....	xlvi
References.....	xlvii



# Liste des tableaux

## Chapitre 2

Tableau I. E. coli strains and plasmids used ..... 62

## Annexe I

Tableau I. Tableau 1 E. coli strains and plasmids used. .... viii

Tableau II. Suppressors of the growth defect of cells lacking topA and rnhA ..... xvii

# Liste des figures

## Chapitre 1

Figure 1.	Les étapes de l'initiation de la réplication chez les procaryotes. ....	23
Figure 2.	Modifications topologiques dans le chromosome au cours de la réplication. ....	27
Figure 3.	Voies de résolution de deux molécules d'ADN en fin de réplication. ....	29
Figure 4.	Surenroulement local produit pendant la transcription. ....	34
Figure 5.	Structure du R-loop. ....	35
Figure 6.	Formation des R-loops selon l'«extended hybrid model» et le «thread back model» .....	37
Figure 7.	Modèle de formation de R-loops chez <i>E. coli</i> . ....	40
Figure 8.	La formation et l'inhibition de la formation des R-loops pendant la transcription .....	41
Figure 9.	Patron de séquençage à haut débit exposant les sites d'origine de réplication chez une souche <i>rnhA</i> <sup>-</sup> .....	46
Figure 10.	Différentes voies de chargement de l'hélicase DnaB sur le chromosome. ....	50
Figure 11.	Schéma d'initiation de la réplication cSDR. ....	52
Figure 1.	Model for constitutive stable DNA replication (cSDR). ....	59
Figure 2.	cSDR in <i>rnha</i> null but not in wild-type cells. ....	65
Figure 3.	cSDR in The <i>dnaT::aph rnhA</i> mutant .....	68
Figure 4.	cSDR in cells lacking type 1A topos. ....	70
Figure 5.	cSDR in <i>topA</i> null but not <i>topB</i> null cells. ....	72
Figure 6.	Deleting <i>topB</i> has no effect on cell morphology and DNA content of an <i>rnha</i> mutant. ....	74
Figure 1.	The ATP-dependent supercoiling activity of gyrase, but not its ATP-independent relaxation activity, is inhibited in crude cells extracts of a <i>topA</i> mutant lacking RNase HI. ...	xiii
Figure 2.	A temperature downshift induces DNA relaxation, not hypernegative supercoiling, in a <i>topA</i> null mutant lacking RNase HI. ....	xvi
Figure 3.	The <i>topA rnhA</i> null strain but not the suppressor clones stops growing during log phase in LB medium. ....	xx

Figure 4. Effects of the *holC2::aph* mutation on cSDR in an *rnhA* null strain..... xxii

Figure 5. Effects of mutations in genes involved in replication on supercoiling and chromosome segregation in a *topA rnhA gyrB(Ts)* strain..... xxv

Figure 6. Effects of mutations in genes involved in nucleotide metabolism on chromosome segregation in a *topA rnhA gyrB(Ts)* strain and on cSDR in an *rnhA* null strain. .  
..... xxviii

Figure 7. Effects of mutations in genes involved in fimbriae synthesis on supercoiling and chromosome segregation in a *topA rnhA gyrB(Ts)* strain..... xxxi

Figure 8. Effects of mutations in genes involved in fimbriae synthesis on cSDR in an *rnhA* null mutant ..... xxxiii

Figure 9. cSDR in *topA rnhA gyrB(Ts)* cells..... xxxv

## Liste des abréviations

°C : Degrés Celsius

ADN : acide désoxyribonucléique

ADP : Adénosine diphosphate

ARN : acide ribonucléique

ARNt : ARN de transfert

ARNm: ARN messenger

ARNr : ARN ribosomal

ARNs: petits ARN

ATP : Adénosine triphosphate

bp: paire de bases

CAP : Catabolite activator protein

cSDR : Réplication stable et constitutive de l'ADN

CTD : Domaine de terminaison C'

DAPI : 4', 6-diamidino-2-phenylindole

dNTP : Désoxyribonucléotide

DUE : Élément de séparation de l'ADN

*E. coli* : *Escherichia coli*

EdU : Éthynyl-2'-deoxyuridine

Fig : Figure

H : Heures

Hot : Hotspot

$\Gamma$  : Nombre de paires de bases par tour d'hélice

iSDR : Réplication stable et inductible de l'ADN

IPTG : Isopropyl  $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside

kan<sup>r</sup> : Résistance à la kanamycine

kb : kilo base

LB : Lysogenic Broth

Lk : Linking number

$\mu\text{g}$  : Microgramme  
 $\mu\text{l}$  : Microlitre  
 $\mu\text{M}$ : Micromolaire  
ml: millilitre  
mM: Millimolaire  
N : Nombre de paires de bases  
NTD : Domaine de terminaison N'  
NTP :Nucléoside triphosphate  
OD : Densité optique  
*oriC* :Origine de réplication C  
*oriK* : Origine de réplication K  
pb : Paire de base  
Par<sup>-</sup> : Phénotype d'une partition défective  
PCR : Réaction de polymérisation en chaîne  
RDTT : terminaison de la transcription dépendante de Rho  
RNase : Ribonucléase  
Rif : Rifampicine  
*rut* : site Rho-utilisation  
SSB : protéine de liaison d'ADN simple brin  
NaCl : Chloride de sodium  
SDR : réplication stable de l'ADN  
 $\sigma$  : Densité de surenroulement  
Thp : Terminaison en épingle à cheveux  
Ts : Sensible à la température  
Tw : Twist  
UV : Ultraviolet  
Wr : Torsion

# Chapitre 1 : Revue de littérature

## Surenroulement de l'ADN

### Structure de l'ADN

L'ADN renferme toute l'information génétique qui permet le fonctionnement, le développement et la reproduction du vivant qui le possède. Les différentes fonctions qu'accomplit simultanément cette molécule complexe pour pouvoir soutenir la vie cellulaire dépend largement de sa structure. Telle que décrite par le modèle classique de Watson et Crick en 1953, la molécule d'ADN est composée de deux brins complémentaires qui s'organisent sous la forme d'hélice(1). L'élément de base de ce polymère est le nucléotide, une molécule organique qui se compose d'une base azotée, un 2'-désoxyribose et un groupement phosphate. Les nucléotides s'organisent en chaîne via la formation d'une liaison 3'-5' phosphodiester entre les 2'-désoxyriboses, communément appelés sucres ou pentoses. Le groupement 3'hydroxyle d'un sucre est donc attaché au groupement phosphate appartenant au 5'hydroxyl de la molécule suivante, formant ainsi un brin. D'ailleurs, la chimie de cette liaison affecte la direction de la synthèse de la chaîne qui se fait toujours de l'extrémité 5' vers l'extrémité 3'. La formation de la structure en double brins a lieu lorsqu'une complémentarité de séquence est atteinte entre les bases azotées des chaînes nucléotidiques. L'appariement des bases se fait entre purines, l'adénine et la guanine, et pyrimidines, la thymine et la cytosine. L'adénine est complémentaire à la thymine et ensemble ils forment deux ponts hydrogènes, alors que la guanine est complémentaire à la cytosine et forment trois ponts hydrogènes(2). Afin que l'interaction entre les bases azotées soit possible, les brins d'ADN doivent être antiparallèles l'un par rapport à l'autre puisque ces liaisons hydrogène sont asymétriques(1). Les brins s'enroulent ensemble vers la droite, créant une région interne hydrophobe où se retrouvent les bases azotées et une région externe hydrophile avec la colonne pentose-phosphate.

La structure hélicoïdale de l'ADN peut varier selon l'appariement des bases, la séquence l'angle de la liaison phosphodiester, l'hydrophobicité des bases et les conditions environnementales. Ces variations peuvent ultimement avoir un impact sur la stabilité de l'ADN. Majoritairement, l'ADN cellulaire se retrouve sous la forme B-ADN(1). Cette forme

est la plus stable en haute humidité(3), l'information de la séquence d'ADN y est plus facilement accessible par le sillon majeur ("major groove") et elle est plus flexible en cas de courbure(4). Malgré sa stabilité, elle est sensible à la dénaturation causée par une haute température ou un pH extrême. Sous une forme B-ADN, les bases azotées sont perpendiculaires à l'axe de la colonne pentose-phosphate et on retrouve 10,5 pb par tour d'hélice selon les conditions de la solution. La longueur d'un tour est de 3,4 nm et son diamètre est de 2 nm(1).

## Topologie de l'ADN

La structure en double hélice, générée par les liaisons hydrogène entre les sous-unités asymétriques des polynucléotides, apporte une grande stabilité à l'ADN. Cependant, cette forme vient également avec plusieurs inconvénients. L'entrelacement des brins nuit au mouvement rotationnel de la double hélice induit lors de nombreuses fonctions cellulaires essentielles, telles que la réplication. Par conséquent, des changements topologiques seront produits ailleurs dans la molécule d'ADN afin de compenser l'effet contraignant de la double hélice.

Les concepts mathématiques décrivant la topologie de l'ADN sont le nombre d'enroulements ( $Lk$ ), le twist ( $Tw$ ) et la torsion ( $Wr$ )(5). Le nombre d'enroulements est le nombre total de fois que les brins d'ADN tournent autour d'eux.  $Lk$  dépend de l'état topologique de la molécule et demeure conservé tant que les brins ne sont pas clivés. Lorsque l'ADN est dans un état relaxé, la distribution de la valeur  $Lk$  dans la molécule donne une moyenne qui se calcule dans l'équation suivante;  $Lk_0 = N/\gamma$  où  $N$  représente le nombre de paires de bases et  $\gamma$  représente le nombre de paires de bases par tour l'hélice. Normalement, dans les cellules vivantes,  $Lk$  est inférieur à  $Lk_0$  et leur différence donne la valeur de  $\Delta Lk$  (6). Le twist ( $Tw$ ) représente le nombre de rotations qu'effectue la double hélice autour de son axe dans un segment de l'ADN alors que la torsion ( $Wr$ ) représente le nombre de croisements entre les axes de la même molécule d'ADN. La somme des deux représente la valeur de  $Lk$ ;  $Lk = Tw + Wr$ .  $Lk$  est invariable contrairement à  $Tw$  et  $Wr$  qui peuvent s'interconvertir(5). Les activités cellulaires qui enroulent positivement ou négativement l'ADN produisent un stress dans sa torsion. Si possible, la torsion au long de la molécule est soulagée pour former

des  $W_r$ , et ainsi créer le surenroulement de l'ADN(5). Lorsque  $\Delta Lk \neq 0$ , l'ADN subit un stress qui déforme l'axe de la double hélice, soit le surenroulement. Le surenroulement peut être positif ou négatif.

### **Implications cellulaires du surenroulement négatif**

La régulation du surenroulement de l'ADN est essentielle pour la cellule afin de profiter au maximum de ses avantages et de réduire au minimum ses inconvénients. À l'exception des organismes thermophiles, les espèces bactériennes tentent de conserver leur ADN dans un état topologique de surenroulement négatif global. Chez les espèces thermophiles, elles ont évolué de manière à développer un surenroulement positif afin d'augmenter la valeur du twist dans leur molécule d'ADN. Ceci compense l'effet dénaturant de grande chaleur qui normalement déferait le twist et séparerait les brins. Chez les autres organismes, le maintien d'un surenroulement négatif global est favorisé pour plusieurs raisons. Chez *E. coli*, la longueur du chromosome est d'environ 1600 $\mu$ m alors que la taille de la cellule bactérienne est de 1 $\mu$ m de diamètre et 3-5  $\mu$ m de longueur(7). Cette bactérie a donc dû, au cours de son évolution, développer des mécanismes afin de comprimer son chromosome. Il a été décrit que l'enroulement plectonemique est inefficace à la compaction, mais que l'enroulement toroïdal l'est(8). Le surenroulement négatif influence plusieurs procédés qui impliquent l'interaction entre les protéines et la double hélice. Cette topologie particulière génère une tension et une énergie libre qui facilite le déroulement de la double-hélice, c'est-à-dire la séparation des brins. Les protéines impliquées dans la réplication et la transcription de l'ADN sont dépendantes de ce déroulement. De plus, le surenroulement facilite l'interaction d'un complexe protéique avec deux sites distants en les rapprochant. Plusieurs protéines recombinantes actives à des sites spécifiques, de même que certains activateurs/répresseurs transcriptionnels, bénéficient de cette topologie. Le surenroulement peut également être reconnu par des topoisomérases et des recombinases. Les topoisomérases modifient la différence du nombre de liaisons ( $\Delta Lk$ ) dans l'ADN.

Bien que le surenroulement négatif soit un prérequis pour plusieurs activités cellulaires, cette topologie apporte quelques inconvénients. L'énergie libre emmagasinée dans cette conformation favorise la formation de structures alternatives de l'ADN, telles qu'une forme en Z-ADN, des cruciformes et des triplexes d'ADN. Ces conformations réduisent le



twist ( $Tw$ ) de la molécule, ce qui, par compensation, réduit le nombre de torsions ( $Wr$ ) négatives. Si le stress imposé est assez important ( $\Delta Lk$  élevé), ces structures normalement instables seront maintenues. D'autre part, le surenroulement devient problématique lors de la réplication et de la transcription. La cellule devra employer divers procédés afin d'y remédier.

### **Le surenroulement généré par la transcription (« twin-supercoiled domains »)**

Le surenroulement est un état dynamique de l'ADN qui dépend notamment de l'équilibre entre l'activité des topoisomérases. *In vivo*, plusieurs éléments peuvent modifier le niveau de surenroulement et sont classés selon les facteurs affectant les topoisomérases, les facteurs altérant la structure de l'ADN et les facteurs influençant l'énergie cellulaire(9).

Les topoisomérases sont des enzymes qui régulent la topologie du chromosome. Les facteurs altérant la fonction de ces enzymes peuvent ainsi modifier le niveau de surenroulement dans la cellule. Il a été démontré que la source principale de surenroulement négatif provient de l'activité de l'ADN gyrase. Le blocage de cet enzyme par l'ajout d'un inhibiteur réduit considérablement l'introduction de surenroulement négatif dans le bactériophage lambda pendant la super-infection d'un lysogène(10). Il a été également montré que la topoisomérase I prévient l'excès de surenroulement négatif. L'inactivation de cet enzyme dans le mutant  $\Delta topA$  augmente le niveau de surenroulement négatif, à un point tel où la cellule n'arrive plus à croître, sauf si elle développe des mutations compensatoires localisées dans les gènes de la gyrase (*gyrA* et *gyrB*), ce qui réduit le niveau de surenroulement(11, 12). La bactérie érige une croissance saine et rapide lorsque le niveau de surenroulement est maintenu dans un rayon de  $\pm 15\%$ .

Parmi les facteurs qui altèrent la structure de l'ADN se retrouvent ceux qui impliquent la séparation des brins. La transcription est une importante source de surenroulement dans la cellule. Pendant la transcription, la séparation des brins d'ADN par l'ARN polymérase provoque la rotation de la double hélice autour de son axe(13). Ce mouvement crée une hausse du twist en amont du complexe enzymatique, et en une réduction en aval. Puisqu'il n'y a pas de variation en  $Lk$ , le tout se traduit par du surenroulement positif et négatif respectivement(13). Par exemple, dans un petit plasmide avec un seul gène exprimé, les supertours négatifs et positifs vont se rejoindre puis se neutraliser. Chez la bactérie, même si l'ADN est circulaire, sa séparation en domaines ne permet pas au surenroulement de se

répandre au-delà de son domaine, empêchant cette neutralisation. Les bactéries ont donc recours à des topoisomérases afin de rétablir leur topologie. Selon le modèle “Twin supercoiled domain”, la transcription engendre du surenroulement qui dépasse la valeur moyenne du chromosome, mais elle est temporaire grâce à la rapidité d’action des topoisomérases. Ce surenroulement transitoire est résolu grâce à l’ADN gyrase qui enlève le surenroulement positif en avant de la polymérase, alors que la topoisomérase I enlève l’excès de tension négative derrière. Ce modèle est d’ailleurs supporté par plusieurs évidences expérimentales(14). Par exemple, en présence d’antibiotiques inhibant l’activité de la gyrase, la transcription entraîne une accumulation du surenroulement positif(15), alors que la transcription dans un mutant  $\Delta topA$  engendre un surenroulement très négatif (hypernégatif)(11).

## **Topoisomérases de type 1A**

### **Structure des topoisomérases de type 1A**

La découverte de la structure en double hélice de l’ADN a apporté plusieurs questionnements sur le maintien topologique de cette structure dans la cellule. C’est finalement en 1971 que la première topoisomérase a été repérée, initialement nommée protéine  $\omega$ (16), prouvant ainsi que des protéines peuvent jouer des rôles essentiels dans la manipulation de l’ADN.

La topoisomérase IA révèle une structure toroïdale et comporte cinq domaines. Les quatre premiers domaines composent le noyau de l’enzyme et contiennent des motifs conservés importants dans l’activité catalytique alors que le cinquième domaine constitue la queue carboxyle qui est très variable. Les domaines III, II et IV se façonnent telle une arche avec une cavité assez grande pour accueillir une molécule d’ADN simple brin ou double brin. Des résidus de lysine et d’arginine tapissent l’intérieur de cette cavité, créant une charge positive qui facilite l’interaction entre l’enzyme avec la molécule d’ADN(17). L’absence de liens covalents entre les domaines III et I, de même que III et II permet à l’enzyme d’adopter deux conformations différentes : ouverte et fermée.

Sous sa conformation fermée, le site actif pour la transestérification est formé par l’association des domaines I, III et IV. Le domaine I peut interagir avec les nucléotides de la

molécule d'ADN grâce à sa région TOPRIM(18, 19). Il contient également des acides aminés acides qui peuvent lier le magnésium, un élément requis à l'enzyme pour le changement de conformation qui permet la relaxation de l'ADN(20, 21). Le domaine III comporte la tyrosine catalytique sur laquelle la transestérification s'effectue. À la suite de cette réaction, l'extrémité 5' de la molécule d'ADN se lie de manière covalente à cette tyrosine du domaine III alors que l'extrémité 3' s'associe au domaine IV de façon non covalente(22, 23).

Sous sa conformation ouverte, le brin intact est déplacé à travers le brin clivé par la topoisomérase, ce qui enchérit l'enroulement de + 1 Lk et relaxe la molécule d'ADN. Cette conformation dépend du positionnement des domaines II et III qui, ancrés au domaine IV, agissent comme des bras qui peuvent s'ouvrir et se fermer, donnant accès à la cavité de l'enzyme. Cette forme d'arche est créée par l'association de deux plis (topofolds) placés en tandem dans une orientation tête-à-queue. La chaîne du premier pli débute au domaine IV, passe à travers le domaine II et se termine au domaine III alors que le second pli s'entame au domaine III, se continue à travers le domaine II pour se terminer au domaine IV(24). Ces plis comportent des motifs CAP (catabolite activator protein) retrouvés chez plusieurs protéines liant l'ADN(25). L'ouverture de cette arche dépend de deux régions flexibles localisées entre les domaines II et IV(17), ainsi que les domaines II et III(26). Ces charnières sont riches en prolines et permettent un mouvement adéquat des domaines afin d'adopter les différentes conformations nécessaires au fonctionnement de l'enzyme : fermé avec le centre catalytique rétabli et l'ADN fixé dans l'enzyme ou ouvert avec la molécule d'ADN libre de se dissocier de l'enzyme.

Plusieurs sites importants dans la liaison et la relaxation de la molécule d'ADN se retrouvent également en dehors du noyau catalytique de l'enzyme, dans le domaine V. Chez *E. coli*, la queue C-terminal de la topo I comporte trois domaines tetracystéines impliqués dans la liaison et la manipulation des brins d'ADN(27). Ces trois domaines sont des sites de liaison au zinc(28). En absence de ces ions(29), ou de leurs sites de liaison(30), l'enzyme est incapable d'effectuer son rôle de relaxase. Cependant, elle peut lier et couper un brin de la molécule d'ADN(30). Ceci suppose que la manipulation des brins d'ADN pendant la relaxation est sous le contrôle des domaines liant le zinc, alors que le reste de l'enzyme est responsable de la liaison et de la coupure de la molécule d'ADN.

## Topoisomérase I

### Activité relaxase de la topoisomérase I

La relaxation de l'ADN est la principale activité de l'ADN topoisomérase I chez *E. coli*. Cette fonction évite l'accumulation d'un excès de surenroulement négatif, prévient la formation de bulle de dénaturation par la chaleur et prévient également la formation de R-loops.

La contribution de la topoisomérase I dans la relaxation de l'ADN surenroulé négativement a été observée en étudiant divers mutants  $\Delta topA$ . Il a été constaté, par la sédimentation de leur chromosome dans un gradient de sucrose contenant de l'éthidium et par la migration de leur plasmide par électrophorèse en présence de chloroquine, une augmentation de 14% du niveau du surenroulement chez ces mutants(11). Toutefois, l'apparition d'un second site de mutation, étroitement lié aux gènes *gyrB* et *gyrA* de l'ADN gyrase, a eu pour effet de réduire le surenroulement chez le mutant  $\Delta topA$ . Cette mutation diminue le surenroulement de 25%, rendant le chromosome et le plasmide de ces souches moins surenroulés que la souche sauvage(11). L'acquisition de cette mutation compensatoire implique que la topoisomérase I joue un rôle important dans la physiologie bactérienne. Ainsi, l'expression de la topo I est régulée principalement pour contrôler les différents facteurs ayant une influence sur la topologie de l'ADN. Des résultats récents ont démontré, par chromatographie, la possibilité d'une interaction directe entre la topoisomérase I et le complexe de l'ARN polymérase(31, 32). Cette interaction se fait au niveau de la sous-unité bêta de l'ARN polymérase et le domaine C-terminal de la Topo I. Cette fonction peut s'avérer particulièrement importante afin d'apporter directement la Topo I au site subissant des modifications topologiques importantes, ce qui prévient le développement de surenroulement hyper-négatif.

Un exemple de facteur étroitement lié à la topologie de l'ADN est la transcription. Lorsque le chromosome est surenroulé négativement, sa transcription est augmentée(33) alors qu'elle est réduite lorsque le chromosome est relaxé(34). Cette régulation dépend de la position relative entre la région -10 par rapport à la région -35 du promoteur du gène au moment de son contact avec l'ARN polymérase(35). Le surenroulement négatif généré par la gyrase modifie le twist dans la molécule d'ADN, ce qui provoque un changement dans

l'orientation des hexamères 10- et 35-, influençant ainsi positivement l'interaction entre la polymérase et le promoteur(36). De plus, des interactions spécifiques supplémentaires entre la Topo I et l'ADN simple brin pourraient moduler la transcription(37). Ceci démontre la capacité de la Topo I d'agir dans la régulation du génome.

D'autre part, l'augmentation de la température réduit le nombre de twists dans la molécule d'ADN(10) et se traduit par la formation de bulles de dénaturation. Chez *E. coli*, le chromosome développe un excès de surenroulement négatif 10-15 minutes après une hausse de la température. Cependant, 2 minutes après ce changement de température, l'ADN subit une relaxation transitoire qui implique la topoisomérase I et l'ADN gyrase(38). Certaines mutations réduisant ou éliminant l'activité de la topoisomérase I ont occasionné une augmentation de la thermosensibilité du chromosome(39), alors que des mutations dans *gyrA* ont augmenté sa thermorésistance(40). La bactérie a donc besoin de contrebalancer le déroulement de l'ADN provoqué par le changement de température en employant la topo I et l'ADN gyrase dans la relaxation induite par la température(41). Chez *E. coli*, le gène codant pour la topoisomérase I emploie quatre promoteurs pour initier sa transcription, dont l'un est  $\sigma^{32}$  dépendant (P1)(42). Il a été constaté que l'induction de la transcription de *topA* au promoteur P1 par  $\sigma^{32}$  est importante pour acquérir la thermotolérance. Ceci est supporté par l'incapacité des mutants manquant le promoteur P1 de développer une thermorésistance lorsque qu'elle passe de 30°C, à 42°C puis à 52°C, comparativement aux mutants possédant seulement le promoteur P1 qui deviennent thermotolérants(39). La thermotolérance se développe à 42°C pendant le choc de température puisqu'il y a induction des protéines «heat shock»(43).

L'activité de relaxation par la topoisomérase I est également déterminante dans la prévention de la formation des R-loops pendant la transcription. La tension négative générée par l'ARN polymérase derrière la fourche de transcription facilite la séparation des brins, ce qui laisse la possibilité à l'ARN nouvellement synthétisé de se lier avec l'un des deux brins formant ainsi un hybride ADN/ARN. La première indication *in vivo* que l'inhibition de la formation des R-loops était une fonction importante des topoisomérases I provient du fait que la surexpression de la RNase HI, une enzyme qui dégrade l'ARN des R-loops, corrige partiellement les problèmes de croissances d'un mutant  $\Delta topA$ (44). En quantité suffisante, cette enzyme peut inhiber complètement la formation de surenroulement hyper-négatif(45).

L'ADN gyrase et la topoisomérase I régulent la formation des R-loops à travers leur activité contraire(45, 46). En effet, il a été démontré à l'aide d'un gel de retardation et de relaxation qu'il y a formation de surenroulement négatif sensible à la RNase HI, soit des R-loops, dans un plasmide lorsque l'activité de l'ADN gyrase surpasse celle de la topoisomérase I. Des R-loops ont été détectés par la même technique sur le plasmide d'un mutant  $\Delta topA$ (46). D'autre part, des résultats *in vitro* montrent que les R-loops se retrouvent à être des zones d'attrait préférentielles, ou 'hot spots', pour la topoisomérase I(45). Le surenroulement hyper-négatif dépendant de la formation de R-loops est corrélé avec les défauts de croissance de différents mutants  $\Delta topA$ (47, 48). Ainsi, l'inhibition de la formation des R-loops est un rôle important de la topo I et elle accomplit sa fonction soit en relaxant le surenroulement négatif induit par la transcription, ce qui prévient la formation de cet hybride, soit en agissant directement en déstabilisant le R-loop.

### **Topoisomérase III**

La topoisomérase III est la seconde topoisomérase de type 1A chez *E. coli*. Comme la Topo I, elle reconnaît l'ADN simple brin et agit en passant l'un des brins à travers le second suite à son clivage, tel que décrit par le mécanisme de passage de brin(49). Elle est encodée par le gène *topB* son inactivation n'entraîne pas de phénotype important en laboratoire(50). Contrairement à la Topo I qui est activement impliquée dans le maintien d'une topologie adéquate du chromosome(51), la fonction principale de la Topo III se retrouve dans la résolution des simples brins d'ADN de la recombinaison et des intermédiaires de réplication(52). Ceci est supporté par les résultats *in vitro* qui démontrent que la Topo I est beaucoup plus efficace que la Topo III dans la relaxation du surenroulement négatif(53), et par la capacité de la Topo III dans la décaténation des anneaux ADN simple brin(52).

### **Activité relaxase de la topoisomérase III**

La topoisomérase III est moins efficace que la Topo I dans la relaxation de l'ADN(53). Cette différence dans leur rendement peut s'expliquer par l'utilisation d'un mécanisme différent pendant la relaxation. En effet, la Topo III prend des pauses beaucoup plus fréquemment entre les tours de relaxation(54). De plus, elle est 10 fois plus lente dans l'initiation de la relaxation. Ceci peut s'expliquer par la faible reconnaissance de la Topo III à

différents substrats. En effet, la Topo I interagit avec une plus grande région de l'ADN, ce qui donne la capacité d'agir sur une plus grande variété de substrats. Cependant, le taux de relaxation la Topo I est de 40 fois inférieur à celui de la Topo III(54). Malgré la grande processivité de la Topo III, au total la Topo I s'avère grandement plus efficace dans la relaxation de l'ADN. Malgré la faible efficacité de la Topo III dans la relaxation de l'ADN dans une souche sauvage, des résultats *in vitro* et *in vivo* suggèrent qu'elle est impliquée dans la relaxation du surenroulement négatif en agissant directement sur les R-loops(55).

### **Activité décaténase de la topoisomérase III**

L'inactivation de la Topo III n'engendre pas de phénotypes particuliers en laboratoire(50) ce qui complique de manière considérable son étude. L'activité décaténase de la topoisomérase III a été découverte *in vitro*, par l'observation de la décaténation d'un chromosome en répllication en présence de Topo III purifiée(53). Normalement, cette activité est effectuée par les topoisomérases de type II qui, par leur capacité de cliver deux brins à la fois, peuvent démêler les molécules d'ADN nouvellement répliquées, les précaténanes, derrière la fourche répllicative. Les topoisomérases de type I lient seulement l'ADN simple brin, ce qui normalement l'empêche d'agir sur les molécules d'ADN répliquées. Cependant, la Topo III pourrait effectuer la décaténation en agissant sur les régions simple brin du brin discontinu. Cette fonction est difficilement observable puisque la grande activité de la Topo IV masque l'absence de la Topo III, cependant la surexpression de la Topo III a un effet positif sur les mutants *parE* et *parC*(56), soit des gènes codant pour des sous-unités de la Topo IV.

La Topo III exprime également son activité décaténase pendant la recombinaison. Il a été démontré que *topB* est allélique au gène *mutR*, qui lorsque muté, augmente la recombinaison *recA*-indépendante de cinq fois(57). De plus, la délétion du gène *topB* dans un mutant *ruvC* (gène codant pour l'endonucléase RuvC, impliquée dans la résolution des jonctions de Holliday) rend la souche dix fois plus sensible à l'irradiation par l'UV et la surexpression de *ruvABC* permet la construction d'un mutant *topB parE/parC*(56). Ensemble, ces résultats montrent la capacité et l'importance, dans certaines circonstances, de *topB* dans la résolution d'intermédiaire de recombinaison. Il est proposé que la convergence des jonctions de Holliday l'une vers l'autre mène éventuellement à une structure comportant trois segments

simple brin. La Topo II peut ainsi agir sur ces structures et les séparer par sa fonction décaténase.

Des activités de la topoisomérase III ont également été mises en évidence au cours de la terminaison de la réplication de l'ADN. En effet, des systèmes *in vitro* reproduisant la structure des intermédiaires de réplication ont démontré la capacité de la Topo III à effectuer la décaténation en présence d'une hélicase et de protéines SSB(58). Par ce système, qui imite la convergence des fourches de réplication dans la région terminale, il a été possible de proposer un modèle de décaténation alternatif à celui impliquant les Topos de type II. Ces modèles seront présentés plus bas.

## **Rôles cellulaires de topoisomérases**

### **Réplication de l'ADN**

#### **Initiation de la réplication**

La réplication du chromosome chez *E. coli* s'initie au site *oriC*, une région conservée qui s'étend sur 250 pb et se localise à 84.3 minutes. On y retrouve cinq DnaA boxes, soient des sites spécifiques à la liaison de la protéine DnaA. Ces motifs de 9 pb dirigent les événements qui mènent à l'assemblage des réplisomes(59). Les DnaA boxes R1, R2 et R4 sont des sites de hautes affinités, et sont associés aux protéines DnaA pendant pratiquement tout le cycle cellulaire(60), comparativement aux motifs R5 et R3 qui possèdent une affinité intermédiaire. La région *oriC* comporte également des sites de faible affinité aux protéines DnaA, soit les motifs  $\tau$  et I(61). Ces derniers peuvent être reconnus par la protéine seulement lorsqu'elle est complexée à l'ATP. L'importance fonctionnelle des DnaA boxes présentes aux motifs  $\tau$  et I est de diriger l'ordre d'assemblage et l'oligomérisation, ce qui est essentiel pour coordonner l'initiation de la réplication avec le cycle cellulaire(61). La région *d'oriC* comporte également des séquences spécifiques reconnues par les protéines IHF, Fis et SeqA. Lorsque la cellule atteint une certaine masse, la concentration cellulaire de DnaA-ATP favorise la liaison aux motifs de faible affinité à l'intérieur d'*oriC*, soit les sites  $\tau$  et I. Ces liaisons permettent aux protéines DnaA de s'oligomériser et de former un plus gros complexe. Avec la participation des protéines IHF et Fis, le complexe formé par les protéines DnaA plie



l'ADN et occasionne la séparation de ses brins (Figure 1). Cette dénaturation se retrouve dans le site DUE, une région riche en AT comportant trois 13-mers motifs localisés en amont du site *oriC*, qui facilite la séparation(62). Cette ouverture des brins est également favorisée par un surenroulement négatif et par les protéines SSB qui la maintiennent ouverte.

La séparation des brins à l'origine de réplication permet le chargement de l'hélicase réplivative, DnaB(63) (Figure 1). L'hélicase a pour fonction de séparer les brins de la molécule d'ADN afin de supporter le mouvement de la fourche réplivative. La structure hexamérique de DnaB forme un anneau contenant une ouverture centrale dans laquelle passe le brin parental de la réplication discontinue(64) et s'associe avec le complexe réplivatif de l'ADN. La liaison de l'hélicase DnaB à l'ADN simple brin est dépendante de l'ATP, mais également de DnaA(65) et de DnaC(66). L'hélicase réplivative forme un complexe protéique avec six molécules monomériques de DnaC et six molécules d'ATP(67). DnaC possède un rôle régulateur de l'activité de DnaB et est essentiel dans sa livraison à *oriC*. DnaC inhibe l'activité ATPase et hélicase de DnaB(68). Une interaction physique entre DnaA et DnaB(65), de même qu'entre DnaA et DnaC permet le chargement du complexe DnaB-DnaC sur le brin supérieur à *oriC*, et sur le brin inférieur près du Boxe DnaA R1(69). Une fois chargée sur l'ADN simple brin, l'hélicase DnaB interagit avec la primase DnaG. Cette interaction confère un changement de conformation à DnaB(70) et cause sa dissociation avec DnaC. DnaB devient ainsi active(71) et sépare les brins en avançant de 5' vers 3' sur le brin parental de la réplication discontinue. L'interaction de DnaG avec DnaB permet également d'activer l'ARN primase et il y a synthèse de la matrice ARN(72).

La reconnaissance spécifique de l'amorce par la «clamp loader» initie l'assemblage du réplisome (Figure 1). La présence d'ADN simple brin à l'origine augmente sa flexibilité localement, ce qui permet son accommodation dans le complexe protéique(73). La «clamp loader», tel que son nom l'indique, charge la « $\beta$ -sliding clamp» sur la molécule d'ADN. La « $\beta$ -sliding clamp» est un homodimère prenant la forme d'un anneau et encercle l'ADN. Associée au noyau polymérase III, elle glisse sur l'ADN et permet à la polymérase de répliquer plus de 500 nucléotides par seconde, la rendant hautement processive. Afin d'être chargée sur l'ADN, la «clamp loader» ouvre la « $\beta$ -sliding clamp» via une activité ATPase et guide l'ADN en son centre. Par l'hydrolyse de l'ATP, la «clamp loader» referme la « $\beta$ -sliding clamp» autour de l'ADN. Finalement, il y a éjection de la «clamp loader» afin de rendre

disponible le site de liaison pour le noyau polymérase III(74). Le noyau polymérase III se compose de trois sous-unités :  $\alpha$  représentant l'ADN polymérase,  $\epsilon$  représentant l'activité exonucléase 3'-5', et  $\theta$  représentant un facteur stimulant l'activité  $\epsilon$ . Par l'intermédiaire de la protéine  $\tau$ , les noyaux polymérase III sont reliés à la «clamp loader» et forment ensemble l'holoenzyme polymérase III(75). La protéine  $\tau$  relie également l'hélicase répliquative DnaB à l'holoenzyme(76).

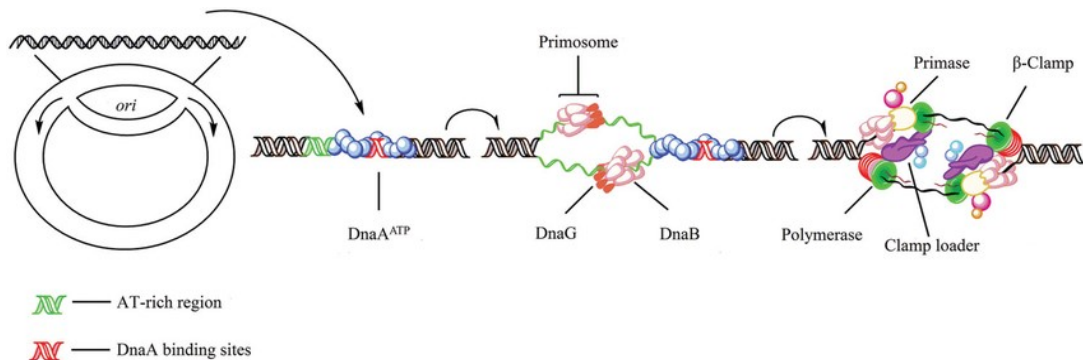


Figure 1. Les étapes de l'initiation de la réplication chez les procaryotes.(77)

*La réplication de l'ADN débute au site oriC, se poursuit de manière bidirectionnelle puis se termine dans la région terminale ter. Les protéines DnaA se lient aux DnaA boxes dans la région d'oriC. Le complexe formé par les protéines DnaA plie l'ADN et engendre la séparation des brins, dans la région riche en AT. L'hélicase répliquative DnaB s'installe sur l'ADN simple brin et s'active suite à son interaction avec la primase DnaG. La «clamp loader» reconnaît l'amorce et initie l'assemblage du réplisome en chargeant la  $\beta$ -sliding clamp et la polymérase III.*

Il est essentiel pour la cellule de réguler la réplication de son chromosome afin d'assurer un événement de réplication par génération, tout en évitant la sur-initiation. L'excès d'initiation de réplication est évité via la séquestration de l'origine, ou encore par l'inactivation des protéines initiatrices. La séquestration de l'origine dépend de la liaison de la protéine SeqA aux origines de réplication récemment répliquées(78). SeqA distingue le statut de méthylation de la séquence GATC entre l'ADN répliqué et non-répliqué. L'adénine de la séquence est reconnue et méthylée par la méthylase Dam. Suite à la réplication, l'ADN est temporairement hémi-méthylée. La liaison de SeqA aux séquences GATC hémi-méthylées prévient leur méthylation par Dam et inhibe une nouvelle initiation de la réplication(79). De

plus, SeqA altère la topologie locale de l'ADN, réduisant ainsi l'affinité de liaison entre DnaA-ATP et les sites  $\tau$  et I.(80) L'initiation de la réplication peut également être régulée via le contrôle de la protéine DnaA. En effet, la transcription du gène est affectée par le moment de la réplication puisque *dnaA* se situe près de l'origine. Ainsi, le promoteur du gène est séquestré aussi longtemps que *oriC* par SeqA, prévenant sa transcription suite à l'initiation de la réplication(81). D'une autre façon, la présence de plus de 300 sites de hautes affinités et de plusieurs sites de faible affinité pour DnaA sur le chromosome affectent la concentration de la protéine libre au cours de la réplication. La duplication du chromosome double le nombre de ces sites, éloignant ainsi DnaA d'*oriC*(82). D'une autre façon, la protéine peut être régulée par les séquences DARS qui, situées à mi-chemin entre *oriC* et *terC*, peuvent former un complexe avec DnaA-ADP grâce à leurs boxes DnaA, et facilite le relâchement de l'ADP de la protéine. Ceci permet la liaison de l'ATP à la protéine nouvellement libre, menant ainsi à sa réactivation(83). DnaA est également régulée par RIDA (regulatory inactivation of DnaA). Pendant l'élongation, la protéine Hda couplée à l'ADP forme un complexe avec la clamp. L'interaction de ce complexe avec DnaA-ATP stimule l'hydrolyse de l'ATP, relâchant ainsi un DnaA-ADP. Le système RIDA est crucial dans l'inactivation de DnaA(84).

#### Implication des topoisomérases dans l'initiation de la réplication

Tel que mentionné plus haut, l'action concertée des protéines DnaA, IHF et Fis à *OriC* plie la molécule d'ADN et crée une ouverture dans la région DUE. Cependant, cette dénaturation localisée est grandement facilitée par du surenroulement négatif. En absence de tension négative, l'ouverture locale des brins s'effectue seulement lorsque DnaA-ATP lie la région simple brin DUE, en amont d'*oriC*(85). En absence de cette région, tel que chez le mutant *oriC ::aph*, l'initiation de la réplication requiert la présence de surenroulement négatif. Chez le mutant *topA*, le surenroulement négatif n'est pas relaxé par la topoisomérase I, ce qui permet la croissance du double mutant *topA oriC ::aph*(86). De la même manière, la délétion de *topA* corrige la thermosensibilité de *dnaA(Ts)*(87). Le surenroulement négatif requis pour l'initiation de la réplication provient de l'activité de l'ADN gyrase(88). L'altération de l'activité de l'ADN gyrase inhibe l'initiation de la réplication à *oriC*(89). Cependant, la délétion du gène *topA* corrige le défaut d'initiation de la réplication dans le mutant *gyrB(Ts)* à

température non permissive(90). Ainsi, l'ensemble de ces résultats indique que le surenroulement négatif, généré par l'ADN gyrase, est requis pour l'initiation de la réplication à *oriC*.

### **Élongation de la réplication**

Les fourches de réplication entament, de part et d'autre de l'origine de réplication *oriC*, la duplication du chromosome jusqu'à leur rencontre dans la région terminale *ter*. La disposition antiparallèle des brins d'ADN complique le sens de la réplication puisqu'elle se fait toujours de 5' vers 3'. La synthèse du brin qui s'effectue dans le même sens que la fourche est continue, cependant celle qui se fait dans le sens inverse est discontinue et doit continuellement être initiée de nouveau. Comme mentionné plus haut, l'amorce ARN sert de site de chargement pour la « $\beta$ -clamp». Pendant la réplication continue, la synthèse d'ADN débute à partir de l'amorce ARN synthétisée à *oriC* et se poursuit jusqu'à la région terminale. Dans le cas de la réplication discontinue, elle requiert la synthèse d'une seconde amorce ARN par la primase DnaG et doit attendre que 2kb de la matrice d'ADN deviennent disponibles. Le fragment d'ADN produit d'une amorce ARN à l'autre est nommé fragment d'Okasaki. Ces fragments sont d'une longueur moyenne de 1.5 kb. La «clamp loader» charge la « $\beta$ -clamp» et recrute la polymérase III à chaque amorce ARN du brin discontinu(91). La polymérase III synthétise l'ADN d'une amorce ARN à l'autre. L'amorce ARN est éventuellement enlevée par l'ADN polymérase I qui, par son activité 5' exonucléase et ADN polymérase, remplace l'ARN en ADN en utilisant l'extrémité 5' du fragment d'Okasaki en aval comme amorce. Des résultats récents suggèrent l'implication de trois ADN polymérases III dans la réplication de l'ADN, dont deux au niveau de la synthèse du brin discontinu(92). Chacune est proposée d'être connectée à l'une des trois sous-unités  $\tau$  de la «clamp loader»(93). L'ADN polymérase III supplémentaire dans la synthèse de brin discontinu améliore la processivité du réplisome et supporte mieux la synthèse des fragments d'Okasaki(94). L'assemblage des polymérases III dans un même complexe protéique coordonne la réplication des deux brins d'ADN.

#### Implication des topoisomérases dans l'élongation de la réplication

L'avancement des fourches de réplication pendant l'élongation engendre plusieurs conséquences topologiques (Figure 2). Ces conséquences varient selon la capacité de

l'holoenzyme réplivative à avancer le long du chromosome, tout en suivant la rotation de la double hélice. Pendant la réplification, la séparation des brins par l'hélicase réplivative engendre une tension positive en amont de la fourche réplivative. L'absence de rotation du complexe réplificatif autour de l'axe de l'ADN engendre une forte tension positive qui se traduit par un niveau de surenroulement positif ainsi que par l'agrandissement de la bulle réplivative(95). En parallèle, la capacité du réplisome à répliquer avec un mouvement circulatoire permet à la tension positive en amont de se redistribuer en aval(95). Cette dilution de la tension provoque cependant l'entremêlement des nouvelles molécules d'ADN fraîchement répliquées, produisant ainsi les précaténanes. Les précaténanes sont les molécules d'ADN sœurs entremêlées avant qu'elles ne soient complètement répliquées. Le surenroulement positif est normalement pris en charge par les topoisomérases de type II(96). Située en amont de l'holoenzyme réplivative, l'ADN gyrase enlève le surenroulement positif accumulé en amont de la fourche réplivative via son activité ATPase(96). La tension positive derrière la fourche de réplification, traduite en précaténanes, est enlevée par l'activité décaténase de la topoisomérase IV(97). Les topoisomérases ne sont pas efficaces au niveau du surenroulement positif, cependant la présence d'un segment d'ADN simple brin provenant d'une cassure ou d'un trou fourni le substrat nécessaire pour agir(98). Plusieurs évidences *in vitro* démontrent la capacité de la Topo III à enlever les précaténanes et d'ainsi supporter la réplification en absence de la Topo IV(99).

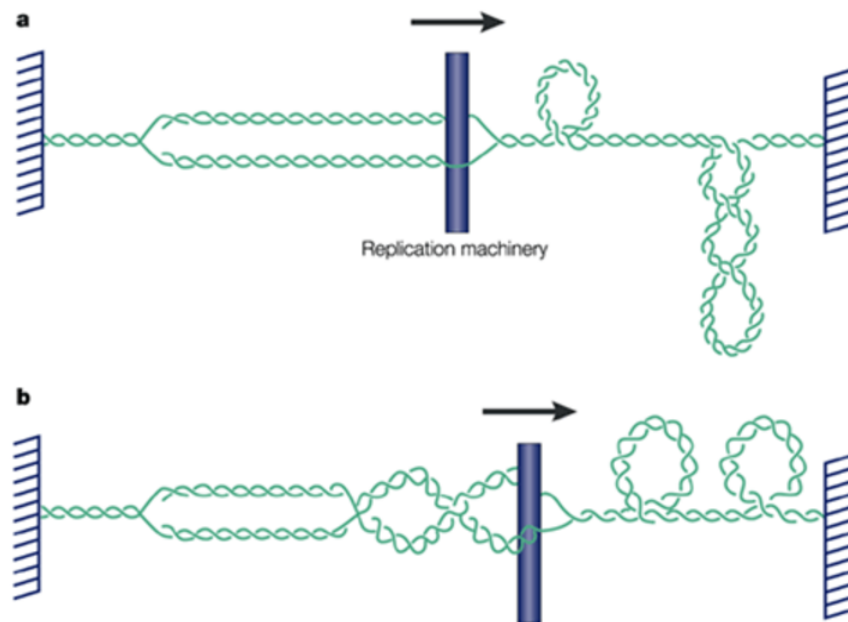


Figure 2. Modifications topologiques dans le chromosome au cours de la réplication © J.C. Wang, 2002, reproduit avec permission.

a) L'absence de rotation du réplisome autour de la molécule d'ADN pendant la réplication engendre un haut niveau de surenroulement positif en aval. b) La rotation du réplisome autour de la molécule d'ADN distribue la tension positive en amont et en aval de la fourche répliquative. En avant de la fourche se forme du surenroulement positif alors qu'en arrière se forment des précaténanes.

### Terminaison de la réplication

La terminaison de la réplication chez les procaryotes se termine toujours dans la même région du chromosome, soit le terminus. La circularité du chromosome combinée à la réplication bidirectionnelle chez les procaryotes engendre une problématique au moment de la rencontre des fourches. Chez *E. coli*, cette région est délimitée par dix séquences *ter* et forme le piège à fourche (fork trap). Ce piège est une adaptation évolutive au chromosome circulaire et possède comme fonction de restreindre la localisation des fourches de réplication dans la région terminale, opposée à l'origine *oriC*. Ces séquences ont le pouvoir d'arrêter les fourches de réplication afin de prévenir la sur-réplication du chromosome(100). Ces séquences de 23 pb

sont asymétriques, ce qui permet le passage des fourches dans un sens, et l'arrêt dans l'autre(101). En d'autres mots, cette orientation permet leur entrée et bloque leur sortie. La capacité des séquences *ter* de bloquer le passage des réplisomes dépend de leur interaction avec la protéine terminatrice, Tus. Tus est une contre-hélicase qui parvient à arrêter le mouvement de la fourche répllicative en inhibant l'activité hélicase de DnaB(102).

#### Implication des topoisomérases dans la terminaison de la réplication

La réplication bidirectionnelle d'un chromosome circulaire, tel que chez *E. coli*, engendre d'importants problèmes topologiques lors de la convergence des fourches de réplication. En effet, la progression des fourches occasionne en amont une accumulation de tension positive. Leur rapprochement réduit l'espace disponible pour la liaison de la gyrase à l'ADN. De plus, la tension positive s'amplifie tellement qu'elle s'oppose à la séparation des brins et provoque l'arrêt des fourches. Deux voies ont été proposées afin de compléter la réplication et de séparer les chromosomes(103) (Figure 3).

À travers l'analyse de la réplication de l'ADN de SV40, il a été observé que le mécanisme majeur de résolution de ces intermédiaires de réplication tardifs était la réplication de la région restante des brins parentaux par l'avancement progressif de la synthèse du brin continu. La tension positive est déplacée derrière l'ADN polymérase par la conversion de chaque tour d'ADN du duplex en caténanes entre les molécules d'ADN sœurs, ce qui permet la progression de la réplication(104). Les caténanes sont finalement déliées par l'activité d'une topoisomérase de type II.

Le second modèle propose que la séparation des brins parentaux survienne avant la fin de la réplication, puis que l'achèvement de la réplication s'effectue sur chacune des molécules d'ADN distinctes(103). En effet, plusieurs systèmes de réplication *in vitro* démontrent la capacité de la Topo I et de la Topo III à effectuer la décaténation d'intermédiaires de réplication tardifs(58, 105). Selon ce mécanisme, la convergence des fourches de réplication dans la région terminale mènerait à la formation d'un intermédiaire de réplication tardif. L'ADN non-dupliqué de cet intermédiaire serait reconnu par une hélicase puis séparé en deux molécules simples brins. L'activité de l'hélicase fournit ainsi le substrat adéquat aux topoisomérases de type 1A qui, par leur activité décaténase, séparent les deux nouveaux chromosomes. Une fois séparés, il a été suggéré que les gaps des monomères soient remplis

par l'ADN polymérase I(106). Cependant, des études supplémentaires seraient requises afin de mieux comprendre les évènements nécessitant ce type de ségrégation.

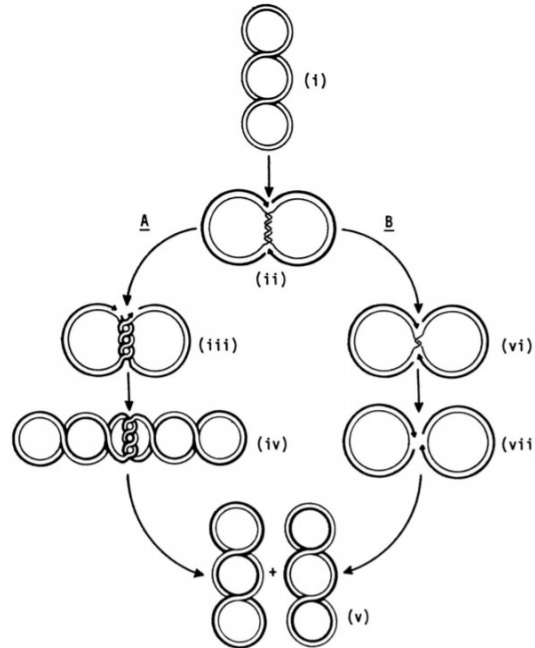


Figure 3. Voies de résolution de deux molécules d'ADN en fin de réplication. © C. Suski, K.J. Mariani, 2008, reproduit avec permission.

*i) Molécule d'ADN surenroulé négativement avant la réplication de l'ADN. ii) La convergence des fourches de réplication accumule la tension positive en amont. Voie A. iii) La réplication continue iv) et forme des caténanes pour chaque tour d'ADN répliqué. v) Décaténation des molécules d'ADN par les topoisomérases de type II afin de former deux molécules d'ADN séparées. Voie B. vi) Séparation des brins parentaux non-répliqués par l'hélicase RecQ. vii) Décaténation des ADNsb parentaux par la topoisomérase III et réplication des gaps par la polymérase I pour former deux molécules d'ADN.*

## La transcription

L'ARN polymérase est la principale enzyme responsable de la synthèse d'ARN. Cette protéine est composée de cinq sous-unités  $\beta\beta'\alpha_2\omega$ (107) et catalyse la polymérisation des NTP pour former une chaîne ARN en suivant une matrice ADN de direction 5' vers 3'. L'ARN polymérase peut lier l'ADN et initier la transcription à partir d'extrémités doubles brins ou



d'une cassure, mais nécessite l'association d'un facteur sigma pour initier la transcription à partir d'un promoteur. *Escherichia coli* comporte sept facteurs sigma différents, qui reconnaissent des promoteurs différents, permettant à la cellule de s'adapter aux différents environnements. Le facteur sigma lie faiblement l'ARN polymérase et forme l'holoenzyme ARN polymérase(108).

L'initiation comporte principalement trois étapes : la recherche du promoteur, l'isomérisation du complexe et la dissociation du promoteur. En amont des gènes se retrouvent les éléments UP (upstream), parmi lesquels on peut distinguer les éléments -10 et -35(108). Ces principaux éléments facilitent l'initiation de la transcription des gènes. Les séquences de ces éléments sont très conservées entre les différents gènes et informent sur leur efficacité. L'holoenzyme ARN polymérase recherche efficacement ses promoteurs en passant soit par un mécanisme de glissement ou un mécanisme de sautillerment. Le facteur sigma reconnaît éventuellement le promoteur, dont les éléments -10 et -35, et s'y lie. La liaison initiale entre l'holoenzyme ARN polymérase et le promoteur forme un complexe promoteur fermé. L'ARN polymérase relaxe d'un tour l'ADN, séparant ainsi les brins de la position -10 à +3 et formant une bulle de transcription(109). À l'intérieur de ce complexe ouvert et instable, le nucléotide +1 du brin matrice se positionne dans le site actif de la polymérase. Le complexe se stabilise lorsque les brins d'ADN se réassemblent en aval de la «clamp». La chaîne d'ARN se forme grâce à la formation de liens phosphodiester entre le 3'OH de l'ARN naissant et le  $\alpha$ -phosphate du NTP arrivant(109). La bulle de transcription s'agrandit alors que l'ARN se synthétise et que le contacte entre l'holoenzyme avec le promoteur -10 se maintient. Après la synthèse de 11 nucléotides, l'holoenzyme relâche le promoteur; après la synthèse de 12-15 nucléotides, c'est le facteur sigma, non-requis pour l'élongation, qui est relâché(109).

L'étape de l'élongation peut se résumer à l'ajout répétitif, mais discontinu, de nucléotides à la chaîne ARN. Le complexe d'élongation englobe 12-14 pb dans la bulle de transcription, 9-10 pb de l'hybride ARN-ADN, 5 nucléotides de l'ARN naissant et 18 pb du duplex ADN en aval(110). La haute stabilité du complexe provient des liens entre l'ARN polymérase et l'hybride ADN-ARN dans le canal principal de l'enzyme ainsi que l'ARN polymérase et l'ARN simple brin dans le canal de sortie(111). Le processus d'élongation peut être séparé en trois étapes basiques : association entre le brin matrice et le nucléoside triphosphate (NTP) complémentaire, formation du lien phosphodiester et translocation de la

chaîne ARN. Dans le centre actif de l'ARN polymérase, le NTP complémentaire se lie au nucléotide de la matrice ADN, occupant ainsi le site. En présence de  $Mg^{2+}$ , l'ARN polymérase catalyse la liaison phosphodiester entre l'extrémité 3'OH de la chaîne ARN avec le NTP  $\alpha$ - $PO_4$ . Ceci se conclut par l'ajout d'un NMP à la chaîne ARN et par le relâchement d'un diphosphate, ce qui permet au site actif de s'ouvrir et de transloquer l'ARN polymérase d'un nucléotide. Pendant la translocation, l'hybride ARN-ADN et la bulle de transcription avancent d'un nucléotide, la nouvelle extrémité 3'OH de la chaîne ARN recule, ce qui libère le site actif et une nouvelle base de l'ADN matrice se retrouve dans le site actif(112). En bref, la cinétique de l'élongation se résume à la balance entre l'ajout d'un nucléotide et au taux de translocation avant/arrière à chaque nucléotide de la séquence matrice. En effet, pendant l'élongation de la chaîne ARN, le mouvement de l'ARN polymérase peut se retrouver entravé par différents obstacles, tels que par une lésion dans la matrice ADN, une protéine liée à l'ADN, une erreur dans l'incorporation, etc. Ceci peut occasionner l'arrêt et même le retour en arrière de la protéine. Si ce retour en arrière se limite à quelques nucléotides, cette situation est réversible et l'ARN polymérase peut reprendre la transcription en avançant la translocation, ou cliver l'ARN par son activité RNase(113). Dans ces conditions, le retour en arrière de la translocation fournit la possibilité aux facteurs de régulation de lier le complexe d'élongation(114), permet la révision de la transcription(115) et favorise la coordination entre la transcription et la traduction(116). Si ce retour en arrière se fait sur une longue distance, l'extrémité 3'OH ressort par le canal secondaire en ARN simple brin, ce qui forme un complexe irréversible occasionnant l'arrêt de la transcription. Cette structure est toxique puisqu'elle bloque la réplication de l'ADN(117). Cependant, l'action de GreA/B et DksA dans le canal secondaire avec l'ARN polymérase clive et enlève l'extrémité 3'OH de l'ARN(118), ce qui dissocie le complexe et prévient une collision avec l'ADN polymérase. Le ralentissement de l'ARN polymérase survient régulièrement lors de la transcription, particulièrement dans le couplage de la traduction avec la transcription(116). Il a été observé qu'en présence d'antibiotique réduisant l'efficacité de la traduction, la vitesse de la transcription se réduit afin de conserver l'équilibre entre ces deux procédés(119).

La programmation de la terminaison de la transcription est importante pour la cellule afin d'éviter d'entamer la transcription de gènes en aval, de recycler les complexes ARN polymérase et de réduire les risques de collision avec le complexe répliatif de l'ADN. La

terminaison peut emprunter une voie intrinsèque ou extrinsèque. La terminaison intrinsèque survient lorsque le transcrit d'ARN forme une structure secondaire à l'intérieur du canal de sortie de l'ARN polymérase, alors que le complexe est positionné sur un hybride ARN-ADN instable. Le tout cause la dissociation du complexe d'élongation. À la fin de la transcription, l'ARN polymérase transcrit un tracé riche en uracile (U-tract) de 7-8 nucléotides qui provoque une pause(120). Cet arrêt permet à l'ARN de former une structure en épingle à cheveux (termination hairpin : Thp) dans le canal de sortie, ce qui stabilise davantage son arrêt(121). La séquence riche en guanine et cytosine disposée en dyade de 7-8 nucléotides en amont du U-tract permet la formation de la Thp. Cette structure favorise la dénaturation partielle de l'hybride ARN-ADN soit via un procédé d'hyper-translocation du complexe d'élongation de 2-4 pb en aval du site de terminaison, empêchant l'addition de nucléotides, soit via le glissement de l'ARN de l'hybride. Cette dénaturation partielle affaiblit les liens entre l'hybride et le complexe(122). De plus, la structure Thp stabilise la forme ouverte du complexe, ce qui fragilise davantage les liens entre l'ARN et le complexe(123), le tout favorisant sa dissociation(124).

La terminaison extrinsèque requiert l'activité translocase de l'hélicase Rho et est reconnue comme étant la terminaison de la transcription dépendante de Rho. Chez *E. coli*, le tiers des ARN de transfert (ARNt), 20% des ARN messagers (ARNm) et plusieurs petits ARN (ARNs) emploient une transcription dépendante de Rho(125). Rho est une protéine hexamérique en forme des anneaux, faisant partie de la famille de RecA. Sous sa forme ouverte, Rho se lie au transcrit d'ARN naissant via la reconnaissance d'une séquence riche en cytosine (Rho-utilisation : site *rut*)(126) et s'y lie via chacun de ses monomères. En présence d'ATP, Rho se referme et transloque la molécule d'ARN en son centre, tout en restant lié au site *rut*. Rho induit la terminaison lorsqu'il entre en contact avec le canal de sortie de l'ARN en créant une hyper-translocation ou un glissement de l'hybride ARN-ADN. L'hyper-translocation est provoquée par Rho qui exerce une force sur l'ARN polymérase, l'avancé ainsi sur la matrice ADN sans qu'il y ait ajout de nucléotides(127). Le tout déstabilise le complexe d'élongation. Dans le cas du glissement de l'hybride, Rho exerce une force sur l'ARN naissant en l'attirant vers elle, déstabilisant ainsi l'hybride ARN-ADN et le complexe d'élongation(128). L'activité de Rho est régulée positivement et négativement par le facteur de transcription NusG. NusG lie directement l'ARN polymérase via son domaine NTD

(domaine de terminaison N') et lie Rho ou la sous-unité ribosomale 30S de la protéine ribosomale S10 via le domaine CTD (domaine de terminaison C'). L'interaction entre NusG et S10 permet le couplage de la transcription et la traduction. La présence de ribosomes sur l'ARN naissant empêche l'interaction de Rho avec le site *rut* et prévient la terminaison. Cependant, NusG-CTD possède une plus grande affinité pour Rho que S10 et lorsque NusG-CTD est non-couplé à S10, il favorise la terminaison en recrutant Rho (129)

#### Implication des topoisomérases dans la transcription

Pendant le processus d'élongation de la transcription, l'ARN polymérase produit l'ARN en suivant la rotation de la double hélice de la molécule d'ADN. De cette manière, la topologie de l'ADN est faiblement affectée. Cependant, cette rotation de l'ARN polymérase peut être entravée par la présence de protéines sur la matrice d'ADN, la synthèse d'une longue molécule ARN, ou encore par l'insertion du polypeptide naissant dans la membrane bactérienne. Dans ces conditions, la transcription engendre des modifications de l'état de surenroulement local(15), mais pas la topologie globale, telle que décrite par le modèle «twin-supercoiled domain» plus haut. Les problèmes topologiques engendrés par l'élongation de la transcription sont semblables à l'élongation de la réplication, mais au final différent puisque la réplication implique la séparation continue et définitive des brins parentaux. En avançant, l'ARN polymérase génère une tension positive en amont qui s'accumule et qui éventuellement mène à l'arrêt du complexe. (Figure 4) L'ADN gyrase enlève cette tension positive et permet la continuation de la transcription(95). Contrairement à cela, l'ARN polymérase génère une tension négative derrière le complexe, ce qui mène à la dénaturation de l'ADN et au développement d'une structure différente du conventionnel B-ADN(51) (Figure 4). Les séquences riches en AT subissent une séparation locale de leur brin alors que les séquences riches en GC développent une structure Z-ADN dans ces conditions. La présence de la topoisomérase I agit sur le surenroulement négatif et relaxe la molécule d'ADN. Le surenroulement local induit par l'élongation de la transcription favorise la formation de R-loops(48). Le R-loops est une structure trimérique d'ADN et d'ARN dans laquelle un brin d'ARN s'hybride à son brin d'ADN complémentaire, laissant le brin non-complémentaire seul. Plusieurs études sur le mutant *topA* démontrent l'importance du surenroulement négatif dans la formation des R-loops(48, 130). La transcription d'opéron ribosomaux dans lesquels la

terminaison de la transcription est réprimée est associée à la formation de R-loops dans le mutant *topA(46)*. Ce phénomène s'explique par l'accessibilité de l'ARN polymérase de se lier avec son brin d'ADN complémentaire puisque les brins sont dénaturés par le surenroulement négatif de la transcription. La topoisomérase I possède ainsi un rôle important dans l'inhibition de la formation des R-loops en relaxant l'ADN surenroulé négativement pendant la transcription.

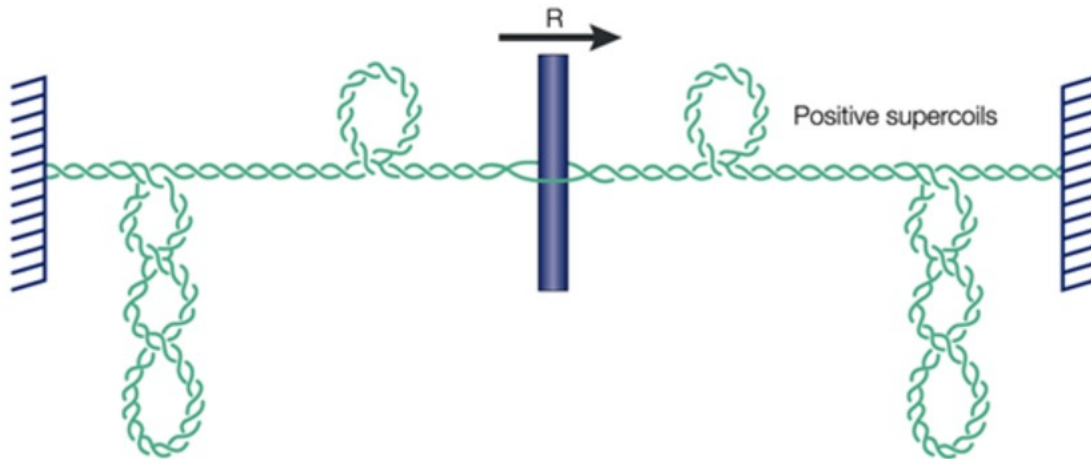


Figure 4. Surenroulement local produit pendant la transcription. © J.C. Wang, 2002, reproduit avec permission.

*L'avancement de l'holoenzyme ARN polymérase lorsque sa rotation autour de la double hélice est inhibée. Cette situation génère une tension positive en aval qui se traduit par la formation de surenroulement positif et génère en amont une tension négative qui se traduit par du surenroulement négatif. Ces domaines topologiques localisés voyagent avec l'ARN polymérase le long du gène pendant la transcription.*

## Les R-loops

La réplication et la transcription sont les deux procédés connus dans lesquels il est attendu de retrouver de courts hybrides ARN-ADN. Cependant, de plus longs hybrides ARN-ADN, soient les R-loops, sont également capables de se former dans la cellule. Le R-loop est une structure trimérique d'acides nucléiques dans laquelle un brin d'ARN s'hybride sur une courte distance avec le brin d'ADN complémentaire, laissant le second brin d'ADN seul

(Figure 5). Chez les eucaryotes, cette structure est employée pendant le mécanisme de commutation isotypique (classe switch recombination; CSR) des immunoglobulines dans les cellules B activées(131). Elle peut également servir d'origine de réplication pour l'ADN mitochondrial(132) et pour le chromosome des procaryotes(133). Sa formation est dépendante de la transcription.

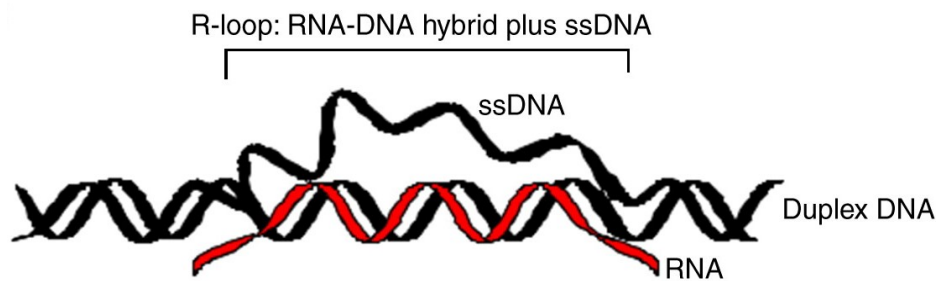


Figure 5. Structure du R-loop (106).

*Molécule trimétrique d'ADN-ARN provenant de l'hybridation de la molécule d'ARN (rouge) avec le brin d'ADN complémentaire. Le brin non complémentaire est déplacé et devient simple brin.*

## Les voies de formation des R-loops

Le mécanisme de formation du R-loop, soit le mécanisme par lequel l'ARN vient s'hybrider avec le brin d'ADN complémentaire, est resté longtemps inconnu. Deux modèles ont vu le jour afin de répondre à la question, le «Thread-back model» et l'«Extended hybrid model» (Figure 6). Dans les deux cas, les R-loops se forment pendant la transcription.

### «Extended hybrid model»

Pendant la transcription, le nouveau brin d'ARN synthétisé est dissocié de sa matrice ADN en sortant du complexe transcriptionnel et les deux brins d'ADN se réhybrident ensemble. Cependant, dans certaines conditions l'ARN peut rester associé à sa matrice ADN et la progression de l'ARN polymérase allonge l'hybride ARN-ADN, formant ainsi un R-loop (Figure 6). La réassociation des deux brins d'ADN dépend de plusieurs facteurs, dont leur séquence, le niveau de surenroulement négatif et la force relative entre l'hybride ARN-ADN et la liaison ARN - ARN polymérase. L'énergie libre créée par le surenroulement négatif

favorise la conservation de l'hybride ARN-ADN. En effet, il existe une corrélation directe entre le niveau de surenroulement et la longueur du R-loop après la transcription par l'ARN polymérase d'*E. coli*(134). L'ARN polymérase s'oppose à cet effet du surenroulement en séparant l'ARN synthétisé du brin d'ADN complémentaire, réduisant ainsi la formation de R-loop(135). L'ajout d'inhibiteurs réduisant l'efficacité de l'ARN polymérase se traduit par un ralentissement de la transcription, et une augmentation de R-loops. Des études avec l'ARN polymérase T7 ont démontré que le surenroulement hyper-négatif est sensible à la RNase HI, mais pas à la RNase A ou à RNase T. Sachant que la RNase A et la RNase T ciblent l'ARN simple brin, ceci sous-entend que l'ARN du R-loop n'a jamais été séparé de sa matrice ADN et que son origine provient de la bulle de transcription(46). Cependant, des études semblables sur l'ARN polymérase d'*E. coli* montrent que le surenroulement hyper-négatif est plus résistant à la RNase HI et plus sensible aux RNases ciblant l'ARN simple brin(48). Ceci suggère que l'ARN naissant, séparé de sa matrice, est impliqué dans la formation des R-loops chez *E. coli* (modèle 2). Malgré tout, ce modèle n'est pas à mettre de côté. Il est possible que l'ARN polymérase d'*E. coli* nécessite un niveau plus élevé de surenroulement négatif pour générer des R-loops via l'extension d'un hybride ARN-ADN. Ceci est appuyé par le fait que la formation des R-loops stables nécessite la présence de l'ADN gyrase lors de la transcription d'une matrice surenroulée avec l'ADN polymérase d'*E. coli*, comparativement à l'ADN polymérase T7. L'ADN gyrase augmenterait le niveau de surenroulement négatif local, tel que décrit par le «twin domain model». La hausse de la résistance des R-loops face à la RNase HI pourrait s'expliquer par la réduction de l'accessibilité de l'hybride ARN-ADN lorsque la transcription se fait par l'ARN polymérase d'*E. coli*, ou alors par la formation d'un hybride ARN-ADN de structure différente.

#### «Thread-back model»

Le second modèle expliquant la formation des R-loops suggère que l'ARN se sépare de sa matrice ADN et sort du complexe de transcription (Figure 6). Alors que l'ARN polymérase continue la transcription du gène, l'ARN naissant se réassocie à son brin d'ADN complémentaire derrière le complexe. Pour se faire, la traduction ne doit pas être intimement liée à la transcription afin de conserver un ARN libre de ribosomes. Supportant ce modèle, il a été observé que l'ajout d'inhibiteurs de traduction stimule le surenroulement hypernégatif chez

le mutant *topA(46)*. La présence de ribosomes traduisant l'ARN naissant prévient le ré-appariement de l'ARN avec son brin d'ADN complémentaire. La formation de R-loop par le «Thread-back model» exige également que les brins d'ADN soient séparés derrière le complexe afin de libérer le brin complémentaire à l'ARN. La séparation des brins peut survenir pendant la transcription en absence de la Topo I par l'accumulation de surenroulement négatif généré par l'ADN gyrase, tel que décrit par le «twin domain model». Le «thread-back model» est supporté par des études *in vitro* à travers une bulle de transcription synthétique ouverte de manière permanente(136). Dans ce système, l'ARN se libère de l'ARN polymérase pour finalement se réassocier à son brin d'ADN complémentaire au niveau de la bulle ouverte. Le tout initie l'assemblage du complexe d'initiation de la réplication. Le «thread-back model» est également appuyé par la sensibilité des R-loops à la RNase A et la RNase T, tel que décrit plus haut(48).

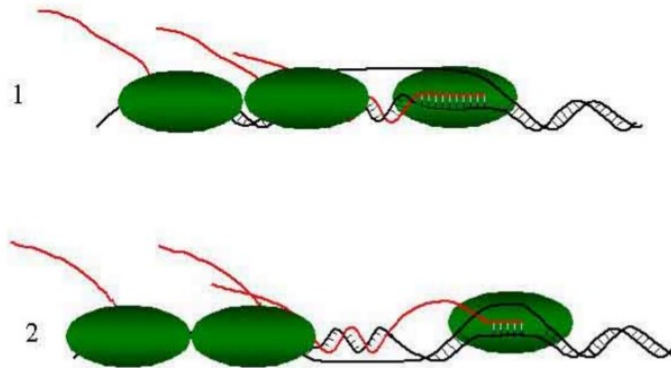


Figure 6. Formation des R-loops selon l'«extended hybrid model» et le «thread back model» (137)

1) «Extended hybrid model»; Pendant la transcription, il y a formation d'un hybride ARN-ADN afin de produire le transcrit. Si l'ARN ne quitte pas le complexe de transcription par la bonne sortie et reste associé à sa matrice d'ADN, l'hybride se prolonge. 2) «Thread-back model»; L'ARN naissant se dissocie de sa matrice, quitte l'ARN polymérase puis se lie à nouveau avec sa matrice. Une fois l'hybride formé, l'ARN s'allonge et forme un R-loop.



## **Facteurs favorisant la formation des R-loops**

### **Les transcrits riches en guanine favorisent la formation des R-loops**

La molécule d'ADN peut varier sa structure de double hélice selon l'ionisation du milieu, la liaison avec des protéines ou encore selon sa séquence en acides nucléiques. Des séquences consécutives en A (T) adoptent une conformation de type B-ADN avec un sillon mineur plus étroit. À l'inverse, des séquences consécutives en G (C) seront plus disposées à choisir une conformation de type A-ADN en condition de déshydratation(138), comme l'ARN ou les duplex ARN-ADN pendant la transcription. Sous cette forme, l'ADN porte un sillon majeur plus profond et un sillon mineur plus large. Cependant, dans des situations normales, il a été observé que la double hélice portant une séquence successive minimum de trois G (C) adopte une conformation entre la structure A-ADN et B-ADN. Cette conformation est instable thermodynamiquement puisqu'elle favorise la respiration de l'ADN (DNA breathing), soit la séparation des brins. Cette respiration est à son maximum dans les séquences consécutives en guanine sur un brin, puis en cytosine sur l'autre.

Selon un point de vue thermodynamique, les hybrides ADN-ARN possèdent une stabilité plus élevée que les hybrides ADN-ADN. Malgré cette caractéristique, l'ARN naissant ne prime pas sur le brin non-complémentaire lorsqu'il tente de se lier avec sa matrice. En effet, la proximité des deux brins d'ADN à la sortie de l'ARN polymérase privilégie leur réassociation par rapport à l'ARN. Cette relation n'est pas exhaustive. En effet, lorsqu'il y a transcription d'un cluster G, les deux brins d'ADN derrière l'ARN polymérase se réassocient l'un avec l'autre, mais sous la conformation A/B-ADN. Ceci facilitera l'hybridation de l'ARN naissant avec son modèle grâce à la respiration de l'ADN qui sépare les brins derrière le complexe. La stabilisation du R-loop dépend de la séquence d'ADN en aval. La présence de nombreux clusters G (C) d'une bonne longueur augmente ainsi sa stabilité puisque cela augmente la différence thermodynamique entre l'hybride ARN-ADN et le duplex ADN-ADN. Le R-loop persiste jusqu'à ce que la différence diminue, puis favorise éventuellement la réassociation des brins d'ADN.

## **Le surenroulement négatif favorise la formation des R-loops**

En condition normale, *E. coli* maintient son chromosome surenroulé négativement. Cependant, ce niveau de tension négative n'est pas suffisant pour favoriser la formation des R-loops. Comme décrit par le «Twin domain model», le surenroulement local atteint des niveaux beaucoup plus élevés. *In vitro*, il a été démontré que la transcription du plasmide pBR322 surenroulé hyper-négativement engendre la formation de R-loops stables(130). L'ajout de la topoisomérase I dans ce système prévient sa formation, alors que l'ADN gyrase l'augmente. Devant l'ARN polymérase, l'ADN gyrase introduit une tension négative qui se déplace derrière le complexe et qui facilite la séparation des brins. Chez une souche sauvage, la Topo I cible cette région d'ADN dénaturée et la relaxe. Selon le «thread back model», en absence de Topo I, les brins d'ADN restent séparés et l'ARN naissant s'hybride avec sa matrice, formant un R-loop. Selon l'«extended hybrid model», la tension négative favorise l'extension de l'hybride. L'ADN gyrase et la Topo I modulent la formation des R-loops *in vivo*.

L'implication de la topoisomérase I dans l'inhibition de la formation des R-loops a été également mise en évidence par l'étude *in vivo* d'une souche *topA gyrB(Ts)* chez *E. coli*(44). Le mutant *topA* est viable seulement lorsqu'il est compensé par une mutation compensatoire dans *gyrA* ou *gyrB*, affectant ainsi l'activité de la gyrase. Ce double mutant est ainsi sensible au froid puisqu'à température permissive, la gyrase récupère son activité et engendre des défauts de croissance chez ce double mutant. Cependant, il a été observé que la surexpression de la RNase HI par le plasmide multi-copies SK760 corrige ces défauts(44). Ceci implique que la formation de R-loop est un problème majeur en absence de la Topo I. À basse température, l'activité de l'ADN gyrase augmente, ce qui favorise la formation des R-loops. L'importance de l'ADN gyrase dans le développement de R-loops stables a été démontrée *in vitro*(48). La transcription d'une matrice ADN avec un niveau de surenroulement plus élevé que chez le mutant *topA* ne développait aucun R-loop stable en absence d'ADN gyrase. Ainsi, le surenroulement induit par la transcription par l'ARN polymérase engendre la formation de R-loops, mais seulement l'ADN gyrase contribue à l'élongation et la stabilisation du R-loops(47) (Figure 7).

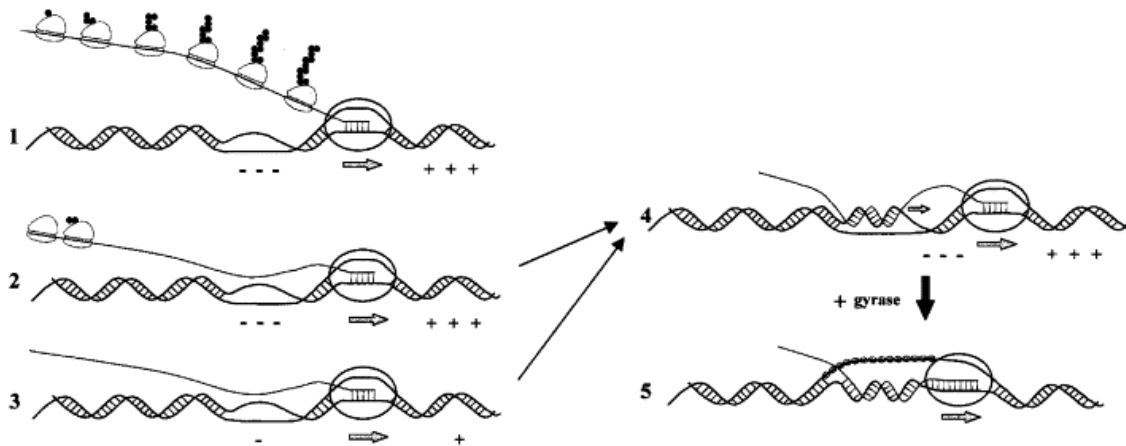


Figure 7. Modèle de formation de R-loops chez *E. coli*. © E. Masse, M. Drolet, 1999, reproduit avec permission.

1) Le couplage serré de la traduction avec la transcription inhibe la formation des R-loops. 2) Le faible couplage entre la traduction et la transcription combiné avec le surenroulement négatif induit par la transcription favorise la formation de R-loops. 3) L'absence de traduction permet la formation de R-loop. 4) Si l'ARN n'est pas dégradé par la RNase HI, élancement du R-loop et surenroulement hyper-négatif. 5) RecA ou SSB se lient au brin d'ADN simple brin du R-loop.

### Modifications post-transcriptionnelles du transcrit ARN

L'ARN polymérase transcrit différents types d'ARN, tels que l'ARN ribosomal (ARNr), l'ARN de transfert (ARNt) et l'ARN messager (ARNm). Selon leur type et selon leur régulation, ces transcrits d'ARN peuvent subir différentes modifications post-transcriptionnelles. L'ARNr et l'ARNt adoptent rapidement une structure secondaire pendant leur transcription, alors que l'ARNm est souvent co-traduit. Ces modifications rapides effectuées co-transcriptionnellement sont importantes dans la prévention de la formation des R-loops puisque le brin d'ARN est non-disponible pour s'hybrider à nouveau avec son brin d'ADN complémentaire (Figure 8 b et c). Dans les cas où l'ARN naissant n'est pas structuré ou pas co-traduit, il est libre de se lier à l'ADN complémentaire et d'ainsi former un R-Loop (Figure 8a). Chez *E. coli*, la terminaison de la transcription dépendante de Rho (RDTT) évite la formation de R-loops en agissant sur l'ARN naissant libre et non structuré(139) (Figure 8d). L'absence des protéines NusG ou Rho chez *E. coli* est létale, cependant elle peut être secourue

par l'expression de UvsW, une hélicase de R-loop du phage T4(140). Elle peut également être sauvée par la surexpression de RecG ou de la RNase HI. Plus précisément, la transcription d'un ARNr chez le mutant topA est associée à la formation de R-loops seulement lorsque l'activité anti-terminaison du gène est fonctionnelle(141). Ceci suggère que la RDTT est importante dans l'inhibition de la formation des R-loops.

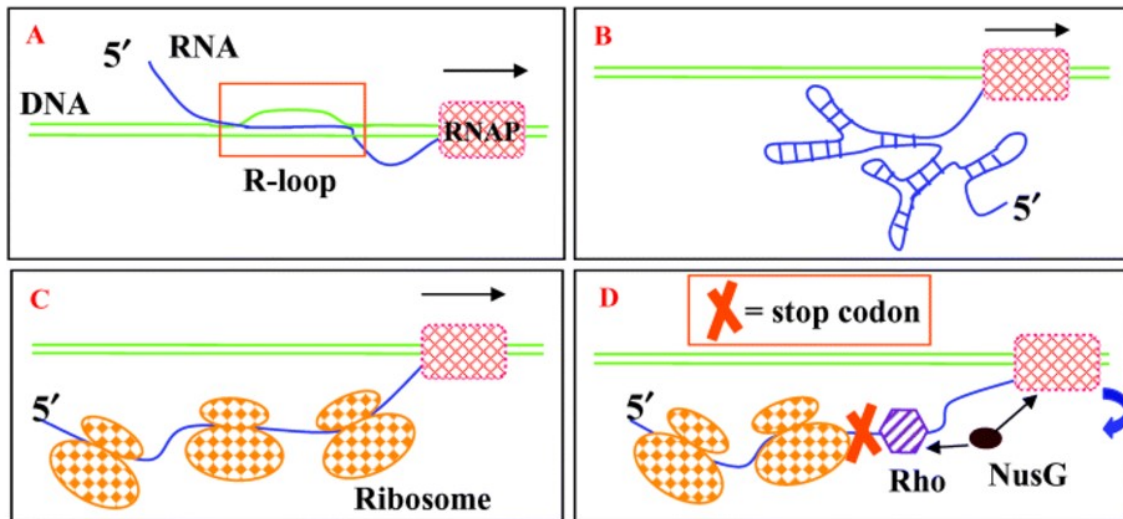


Figure 8. La formation et l'inhibition de la formation des R-loops pendant la transcription(142)

A) Le brin d'ARN naissant libre de ribosomes et de structure primaire peut d'hybrider à son brin d'ADN complémentaire. B) Le brin d'ARN naissant adopte une structure secondaire pendant la transcription et est non disponible pour se lier à son brin d'ADN complémentaire. C) Le brin d'ARN naissant est co-traduit pendant sa transcription et est non disponible pour se lier à son brin d'ADN complémentaire. D) L'arrêt de la traduction laisse une extrémité d'ARNm libre, cependant la terminaison de la transcription dépendante de Rho reconnaît cet ARN grâce à NusG qui est libre de ribosomes, et s'y lie.

## Conséquences de la formation des R-loops

Le développement de R-loops peut devenir néfaste pour la cellule. Sa structure peut bloquer la progression de la fourche de réplication, pouvant causer son effondrement ou alors une cassure d'ADN double brin. Le R-loop peut également être utilisé comme site d'initiation

de la réplication, et amorcer le cSDR (section suivante). Dans certaines conditions, l'extension des R-loops peut engendrer du surenroulement hyper-négatif.

### **Surenroulement hyper-négatif et arrêt de la croissance**

Le surenroulement hyper-négatif de l'ADN est l'un des problèmes majeurs engendré par la formation des R-loops chez le mutant *topA*(48). La Topo I est essentielle dans la relaxation du surenroulement négatif induit par la transcription(47). La sévérité du défaut de croissance du mutant *topA* est corrélée avec le niveau de surenroulement négatif induit par la transcription(47). Il a été démontré *in vitro* qu'en présence d'ADN gyrase et en absence de la Topo I, la transcription par l'ARN polymérase d'*E. coli* induit la formation de R-loops stables (48). De plus, la surproduction de la RNase HI et de la RNase A réduit dramatiquement le niveau de surenroulement hyper-négatif dans ce système(48). Ceci suggère que le surenroulement est provoqué à deux niveaux : soit par la transcription vue sa sensibilité à la RNase A et ainsi que par la formation des R-loops vu sa sensibilité à la RNase HI. La tension négative induite par la transcription s'explique par le «twin-domain model» alors que celle induite par les R-loops pourrait se justifier par l'ancrage de l'ARN polymérase à l'ADN lorsque l'ARN s'hybride avec l'un des brins d'ADN. Cet ancrage inhibe la rotation de la polymérase autour de la double hélice, augmentant ainsi le surenroulement négatif induit par la transcription et favorisant l'élongation du R-loop(48). Ainsi, en plus de former un R-loop, l'ARN libre naissant continue à contribuer au surenroulement hyper-négatif pendant la transcription. En modulant le niveau de surenroulement, la topoisomérase I inhiberait la formation et l'extension des R-loops pendant la transcription.

La corrélation des problèmes de croissance du mutant *topA gyrB(Ts)* à basse température avec l'accumulation du surenroulement hyper-négatif s'explique par le regain d'activité de l'ADN gyrase qui engendre une tension négative et qui favorise la formation de R-loops stables pendant la transcription en absence de la Topo I(48). Les problèmes de croissances de ce même mutant à basse température ont également été corrélés avec une réduction de la synthèse protéique et une accumulation d'ARN tronqués, et le tout peut également être corrigé par la surexpression de la RNase HI(143). La capacité des mutants *topA gyrB(Ts)* à croître et à relaxer leur chromosome après un «downshift» de température à 28°C et 26°C, mais pas 21°C, indique que les défauts de croissance et d'accumulation d'ARN

tronqués sont reliés au surenroulement hyper-négatif(144). Ceci indique également que la RNase HI corrige ces problèmes en agissant sur le surenroulement hyper-négatif. Cependant, à 21°C la surexpression de la RNase HI se montre toxique chez ce double mutant(144). Il a été démontré *in vitro* que la transcription d'une matrice surenroulée hyper-négativement mène à l'extension des R-loops, et cela indépendamment de la séquence(144). À 21°C, l'activité de l'ADN gyrase est très élevée et le niveau de RNase HI insuffisant pour éviter le développement d'un surenroulement hyper-négatif et la formation de R-loops stables. L'activité de la RNase HI dégrade l'ARN des R-loops indépendamment des séquences, ce qui empêche l'accumulation d'ARN complets et inhibe la croissance. Ainsi, lorsque l'ADN n'est pas surenroulé hyper-négativement, la formation de R-loops stables est prévenue et la dégradation de l'ARN par la RNase HI est insignifiante. La RNase HI devient toxique seulement en présence d'ADN surenroulé hyper-négativement car cela mène au développement de R-loops stables et à la dégradation de l'ARN(144).

## **Réplication stable et constitutive de l'ADN (cSDR)**

L'initiation de la réplication du chromosome est un procédé hautement régulé qui survient à un endroit et à moment précis pendant le cycle cellulaire. Chez *E. coli*, elle se produit à l'origine normale de la réplication du chromosome, *oriC*. Afin d'assembler une fourche de réplication et d'initier la réplication, les brins du duplex doivent préalablement être séparés localement. Dans la région *oriC*, la dénaturation locale du duplex ADN est dépendante de son interaction avec la protéine DnaA. L'initiation de la réplication DnaA/*oriC* requiert la synthèse protéique et de l'ARN, et est ainsi inhibée en présence de chloramphénicol ou de rifampicine(145). Cependant, dans certaines conditions, des cycles d'initiation de réplication d'ADN ont été observés en absence de synthèse protéique(146). Ce type de réplication a été nommé : la réplication stable de l'ADN (SDR). Ce type de réplication peut être activé par l'induction d'une réponse SOS et est reconnu comme étant la réplication stable et induite de l'ADN (iSDR). Dans les cellules où une réponse SOS est induite, la dénaturation locale du duplex provient de la formation d'un D-loop, un intermédiaire dans la recombinaison homologue(147). Cette structure permet l'assemblage d'une fourche de réplication. Dans d'autres circonstances, la formation et la stabilisation d'un R-loop pendant la transcription

peuvent également servir d'origine de réplication et permettre une réplication stable et constitutive de l'ADN (cSDR).

La mutagenèse de cellules avec la nitrosoguanidine, suivi de leur exposition au chloramphénicol, a permis d'isoler des mutants possédant un phénotype de cSDR, dit Sdr<sup>c</sup>(148). Contrairement à une souche sauvage qui cesse la réplication après 90 minutes, ce mutant *sdrA* continue d'incorporer de la [H<sup>3</sup>]-thymine cinq heures suite à l'exposition au chloramphénicol, qui inhibe la synthèse protéique(148). Cependant, en présence de rifampicine, qui inhibe la transcription, le mutant *sdrA* n'arrive plus à répliquer l'ADN, comme chez la souche sauvage. Plus tard, il a été observé que le gène *sdrA* se situait près du gène *rnhA* (RNase HI) sur la carte chromosomique et que ces gènes étaient alléliques. Ainsi, le mutant *sdrA* ne possédait pas d'activité RNase HI et c'était la déplétion de cette activité enzymatique qui initiait le cSDR(149).

### **cSDR dans une souche déficiente en RNase HI**

Les ribonucléases H sont des endoribonucléases qui aident à prévenir l'accumulation d'ARN dans le chromosome en dégradant l'ARN des hybrides ARN-ADN(150). Ces enzymes reconnaissent et hydrolysent spécifiquement le lien phosphodiester P-O3' de l'ARN hybridé à l'ADN(151). Elles ont un rôle important dans la réplication, la réparation et la transcription de l'ADN. Il existe deux types de ribonucléases H. Le type 1 hydrolyse l'ARN des hybrides de longueur supérieure à quatre nucléotides consécutifs, tels que les amorces ARN pendant la réplication et les R-loops(72). Le type 2 enlève les plus petits segments, comme les rNTP qui proviennent d'une erreur d'incorporation par la polymérase répllicative(152). La RNase HI est une ribonucléase de type 1 et est encodée par le gène *rnhA*. La RNase HI possède un rôle particulièrement important dans la réplication de l'ADN en conservant la spécificité de la réplication au système *dnaA/oriC* en inhibant l'initiation de la réplication à des origines différentes du locus *oriC*. En absence de RNase HI, la réplication de l'ADN s'initie à des sites illégitimes dans le phage M13 et  $\Phi$ X174, démontré à travers des systèmes réplcatifs d'ADN *in vitro*.

La délétion de la région *oriC* ou l'inactivation de la protéine DnaA inhibe l'initiation de la réplication normale du chromosome. Cependant, la synthèse d'ADN persiste et de nouvelles rondes de réplication s'initient lorsque la RNase HI est inactive dans une souche

*oriC* ou *dnaA*. La capacité d'un mutant *rnhA* de rendre la réplication *oriC*/DnaA dispensable suggère la présence d'un mécanisme de réplication alternatif(149). Pendant la transcription, le transcrit d'ARN naissant peut parfois s'hybrider avec le brin d'ADN complémentaire et ainsi former un R-loop. Cet hybride ARN-ADN est normalement éliminé par la RNase HI. En absence de RNase HI, le R-loop se stabilise et l'ARN de l'hybride peut servir d'amorce comme origine de réplication pour le cSDR(149). Cette interprétation explique la sensibilité du cSDR à l'action de la rifampicine car la transcription est essentielle à la formation des R-loops. Ainsi, l'inhibition de la transcription réprime par le fait même la formation de R-loops, l'origine de réplication du cSDR. Des études *in vitro* suggèrent une interaction entre la RNase HI et les protéines SSB, lesquelles interagissent avec l'ADN simple brin, et qu'une telle interaction augmente l'activité nucléase de la RNase HI(153). Les protéines SSB pourraient ainsi aider l'enzyme à localiser des hybrides ARN-ADN. Normalement, l'amorce ARN à *oriC* est protégée de l'action de la RNase HI grâce aux protéines DnaA qui viennent s'y lier. Ainsi, la RNase HI a pour fonction de déstabiliser les R-loops afin d'inhiber l'initiation de la réplication en dehors de la région *oriC*.

## **Caractéristiques de la réplication cSDR**

Tel que mentionné plus haut, la réplication cSDR est indépendante de la synthèse protéique. Contrairement à une souche sauvage, le mutant *rnhA* continue sa synthèse d'ADN lorsqu'elle est exposée au chloramphénicol(148). Cependant, comme la réplication *oriC*/DnaA, elle est dépendante de la transcription. L'exposition du mutant *rnhA* à la rifampicine, un inhibiteur de l'ARN polymérase, inhibe l'initiation de la réplication cSDR(148). Ceci s'explique par l'importance de la transcription dans la formation du R-loop, qui lui sert d'amorce pour la réplication cSDR. Les cellules *rnhA* se répliquant seulement par le cSDR sont de tailles hétérogènes, ce qui suggère que ce type de réplication n'est pas couplé à la masse et que son initiation est aléatoire(154). Le taux de réplication cSDR est grandement inférieur à la réplication *oriC*/DnaA, soit à 40% et réduit la quantité d'ADN totale de 50%(154). Le cSDR est ainsi largement moins efficace. Comme la réplication normale, le cSDR est bidirectionnel, semi-conservatif et peut répliquer le chromosome en entier(147). Chez le mutant *rnhA*, le cSDR fonctionne même en présence de la réplication normale(154), ce qui peut s'avérer problématique et engendrer des collisions de fourches en dehors de la



région terminale de la réplication. La réplication cSDR commence aux sites *oriK*, soit les sites où les R-loops se forment et se stabilisent. Les sites *oriK* se retrouvent dispersés sur le chromosome, et deux d'entre eux se retrouvent dans la région terminale(155). *OriK* possède une efficacité d'initiation nettement inférieure que *oriC*(147) (Figure 9).

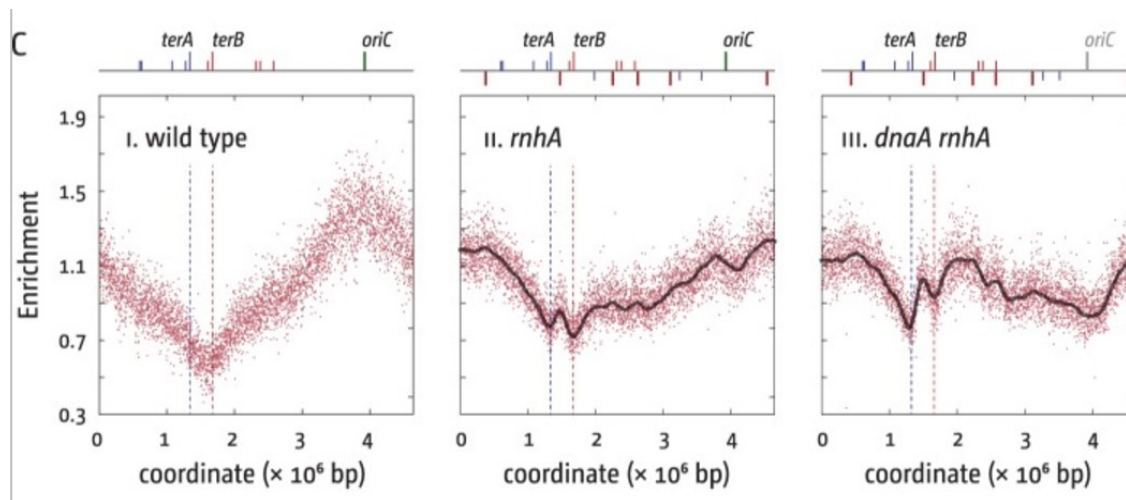


Figure 9. Patron de séquençage à haut débit exposant les sites d'origine de réplication chez une souche *rnhA*<sup>-</sup> (156)

La souche sauvage contient seulement un pic d'origine de réplication, *oriC*. Dans un mutant *rnhA*, on retrouve plusieurs pics d'origine de réplication distribués au long du chromosome : les sites *oriK*. Dans un mutant *rnhA* où la réplication normale *DnaA/oriC* est inhibée par l'inactivation du gène *dnaA*, on observe plusieurs pics de réplication, mais aucun localisé à *oriC*.

## Techniques courantes pour étudier le cSDR

Le mutant *rnhA* parvient à répliquer son chromosome en entier par le cSDR. En présence d'un inhibiteur de synthèse protéique, seule la réplication cSDR survient dans le mutant puisque le système *DnaA/oriC* est inhibé. De la même manière, l'inactivation du gène *dnaA* dans le mutant *rnhA* limite le type de réplication à ceux qui sont cSDR. L'utilisation du mutant *rnhA* s'avère particulièrement pratique dans l'étude des gènes impliqués dans le cSDR. En effet, la capacité d'un gène d'intérêt modifié (insertion, délétion, surexpression, etc.) à affecter la croissance d'un mutant *rnhA dnaA* ou d'un mutant *rnhA* en présence de chloramphénicol révèle sa possible implication dans le cSDR. Cette technique est

particulièrement intéressante pour étudier les protéines qui favorisent la réplication cSDR, mais pas pour celles qui la réduisent. Majoritairement, la combinaison d'un gène impliqué dans l'inhibition du cSDR avec le mutant *rnhA* est létale (Ex : *recG*(147) et *topA*(44)). De plus, contrairement au mutant *rnhA*, les mutants *topA* et *recG* n'arrivent pas à répliquer leur chromosome en entier par le cSDR(147), ce qui complique l'observation du cSDR dans ces mutants.

Une autre façon d'étudier la réplication cSDR est par la mesure de la synthèse d'ADN via l'incorporation de [ $H^3$ ]thymine(157). Pendant la réplication de l'ADN, l'ADN polymérase prend des dNTP et les polymérise pour former le nouveau brin d'ADN. Avec la présence de [ $H^3$ ]thymine dans le cytoplasme, l'ADN polymérase emploie une thymidine radioactive lors de la polymérisation. Les nucléotides radioactifs polymérisés au cours de la réplication sont ensuite détectés par autoradiographie. Cette technique peut s'avérer intéressante dans l'étude du cSDR puisqu'il est ainsi possible de mesurer le taux de réplication indépendant de *DnaA/oriC* soit en les exposant à un inhibiteur protéique, soit en y inactivant le gène *dnaA*. De plus, il est possible de détecter du cSDR sans que le mutant requière la capacité de répliquer son chromosome en entier. Cependant, cette technique nécessite l'utilisation de souches avec un contexte génétique particulier *thy-* afin que la cellule utilise la thymine radioactive(157). De plus, cette technique passe par une dénaturation des cellules afin de détecter la [ $H^3$ ]thymine, ce qui limite les observations à un niveau de population plutôt que cellulaire(157). Finalement, cette technique est également ardue et lente puisque la détection par autoradiographie peut durer plusieurs jours(157). Le développement d'une nouvelle technique de détection et de mesure du cSDR serait ainsi intéressant dans le cadre de l'étude des topoisomérase 1A dans le cSDR.

## **Protéines requises pour le cSDR**

### **Implication de la protéine recA**

L'absence de protéine RNase HI fonctionnelle dans le mutant *rnhA* permet la synthèse d'ADN dans une souche où *oriC* est délétée ou *dnaA* inactivée. Cependant, la capacité du mutant *rnhA* à effectuer du cSDR dépend de la présence d'une protéine RecA fonctionnelle(158). Ceci suggère que la protéine RecA est indispensable dans la réplication

cSDR. RecA est une protéine essentielle pour la réparation et le maintien de la stabilité génomique de l'ADN. Par son activité de co-protéase, elle peut induire une réponse SOS en médiant la réaction d'auto-clivage du répresseur LexA. Parallèlement, elle possède une activité recombinase importante qui promeut le pairage homologue et l'échange des brins pendant la recombinaison homologue(159). Son rôle dans le cSDR n'a pas encore été déterminé avec certitude. Cette protéine est requise spécifiquement pendant l'initiation du cSDR puisque son inactivation n'empêche pas l'achèvement de la ronde de réplication, mais inhibe l'initiation d'une autre(158). Toutefois, la nécessité de la protéine recA dans l'initiation du cSDR peut être détournée par l'inactivation de *rin*. Le gène *rin* est un suppresseur extragénique de RecA et supprime tous les défauts de recA dans le cSDR, sans restaurer son activité de recombinaison homologue(158). Cependant, la mutation dans *rin* peut substituer dans son activité recombinase. En effet, l'inactivation de RecBCD par une mutation dans *recB* n'a pas d'effet sur le cSDR(160), ce qui indique que les étapes initiales de la recombinaison homologue ne sont pas impliquées. De la même manière, l'inactivation de protéines impliquées dans la migration et la résolution des jonctions de Holliday (RuvA et RuvC), et de protéines impliquées dans les étapes tardives de la recombinaison homologue (RecF, RecD et RecJ) n'affectent pas le cSDR(159). Ainsi la répression de l'activité recombinase de recA bloque le cSDR, mais ses propriétés biochimiques essentielles dans le pairage homologue et l'échange de brin ne le sont pas. La seule fonction requise pour le cSDR est l'activité recombinase de RecA. Il est supposé que RecA reconnaît l'ADN simple brin déplacé dans le R-loop, s'y lie et facilite l'interaction des différentes protéines impliquées dans l'assemblage du primosome au site. D'autres évidences *in vitro* supportent que l'activité recombinase de RecA catalyse la réhybridation efficace de l'ARN avec son brin d'ADN complémentaire(159). Le R-loop ainsi formé pourrait servir de site d'initiation de réplication.

### **Implication des ADN polymérases**

*E. coli* possède cinq types différents d'ADN polymérases. L'ADN polymérase III est la principale polymérase impliquée dans l'élongation de la réplication normale du chromosome. Par son activité 5'-3' polymérase, elle synthétise l'ADN nécessaire pour la duplication du génome. Cette activité est également requise pour les étapes d'élongation des réplifications alternatives, telles que le cSDR(147). La réplication cSDR nécessite également l'ADN

polymérase I (*polA*) au cours de son initiation. Cette polymérase est particulièrement reconnue pour ses fonctions dans la réparation de l'ADN et dans le remplacement des amorces ARN en ADN entre les fragments d'Okazaki. L'ADN polymérase I est un polypeptide simple qui possède trois activités enzymatiques différentes : 5'-3' exonucléase, 3'-5' exonucléase et 5'-3' polymérase(161). Seules ses fonctions de polymérase et de 5'-3' exonucléase sont essentielles au cSDR puisque leur inactivation rend le mutant *rnhA dnaA*(Ts) thermosensible(161). Il est proposé que l'ADN polymérase I reconnait l'extrémité 3' de l'ARN du R-loop et, par son activité polymérase 5'-3', rallonge le R-loop en synthétisant de l'ADN. Plus tard, une autre molécule d'ADN pol I enlève l'ARN de l'hybride par son activité 5'-3' exonucléase(161).

### **Implication des protéines du primosome**

Dans les cas où il y a arrêt de la fourche de réplication, la bactérie utilise des protéines primosomales afin de réinsérer le réplisome et de repartir la réplication. Ces protéines incluent PriA, PriB, PriC, DnaT et Rep. La formation d'une fourche de réplication dépend de la capacité à charger l'hélicase DnaB sur l'ADN. Ici, excluant l'initiation de la réplication à *oriC*, elle y arrive en employant trois mécanismes différents ; PriA/PriB/DnaT, PriA/PriC et PriC/Rep. Le système PriA/PriB/DnaT agit préférentiellement sur l'extrémité 3'OH du brin continu sur la fourche arrêtée, dans une ouverture de 0-6 nucléotides (comme une structure D-loop), mais de récentes études suggèrent qu'il peut également agir dans de plus grandes ouvertures(162). La protéine PriA reconnaît la fourche abandonnée ou le D-loop grâce à la structure en épingle à cheveux de l'ADN et aux protéines SSB qui lient l'ADN simple brin du brin discontinu. Après s'être lié à la région C-terminal de la protéine SSB, DnaT et PriB viennent s'associer avec PriA afin de former un complexe qui chargera l'hélicase DnaB sur l'ADN simple brin du brin discontinu(162). Le système PriC agit sur les fourches arrêtées, sur le brin continu, dans les grandes ouvertures dans l'ADN (plus de cinq nucléotides). De son côté, à elle seule PriC peut catalyser la liaison de DnaB sur l'ADN simple brin(162).

La capacité du mutant *rnhA* à effectuer du cSDR est dépendante de la présence de la protéine PriA. En effet, l'inactivation de *priA* est létale pour la cellule qui réplique seulement par cSDR(160). Son rôle dans le chargement du réplisome n'est cependant pas suffisant pour initier la réplication cSDR. En effet, la présence de différentes mutations affectant différentes fonctions de PriA expose la nécessité de l'activité ATPase, hélicase et d'interaction protéine-

protéine pour faire du cSDR(163). L'inactivation de DnaC dans le double mutant *dnaA rnhA* n'inhibe pas sa croissance, mais la ralentit, ce qui suggère un certain niveau de l'implication de DnaC dans le cSDR(163). La délétion de *priB*, contrairement à *priC*, n'est pas tolérée au sein du double mutant *dnaA rnhA*(163). Ceci suggère que, comme PriA, PriB est essentielle dans la réplication cSDR. Cependant, en absence de *dnaC*, la réplication cSDR requiert autant PriC que PriB et PriA(163). En ce qui concerne Rep, son absence est létale dans le mutant *rnhA*, mais peut être sauvée en absence de DnaC(163). Ceci suggère qu'elle est également requise pour le cSDR dans une souche *dnaC*<sup>-</sup>. L'implication de toutes ces différentes protéines durant le cSDR peut s'expliquer par des différences dans les structures du substrat. La liaison de l'ADN simple brin du R-loop avec des protéines SSB peut favoriser l'implication de la protéine PriA, alors que sa liaison avec RecA peut l'être avec PriC et *rep*(163). Dans tous les cas, l'implication de la protéine DnaT dans le chargement du primosome à *oriK* n'a pas encore été explicitement démontrée. Cependant, des évidences génétiques récentes suggèrent un rôle important dans la réplication cSDR(147).

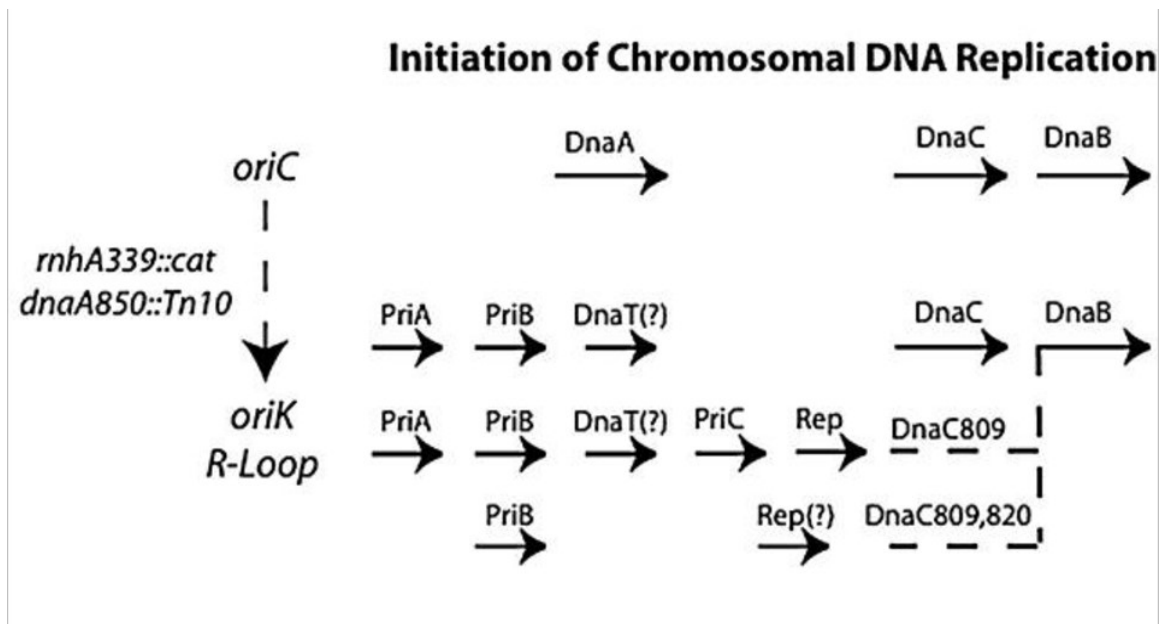


Figure 10. Différentes voies de chargement de l'hélicase DnaB sur le chromosome (163)

*Le chargement de DnaB pendant l'initiation de la réplication peut s'effectuer à oriC et oriK. L'initiation à oriC est dépendante de l'activité de DnaA et le chargement de dnaB est*

dépendant de l'activité de *DnaC*. L'initiation à *oriK* est indépendante de *DnaA* et ne requiert pas toujours l'activité complète de *DnaC* pour charger l'hélicase.

## Modèle d'initiation de la réplication cSDR

Comme mentionné précédemment, la réplication cSDR est indépendante de la synthèse protéique, mais dépendante de la transcription(147). Elle est également dépendante de l'activité 5'-3' polymérase et 5'-3' exonucléase de l'ADN polymérase I(161). Elle requiert l'activité recombinase de *RecA*, mais est indépendante de la recombinaison homologue(159). Finalement, elle nécessite également l'activité des protéines du primosome telles que *PriA*(160). Ensemble, ces informations indiquent que la réplication cSDR n'origine pas à partir d'une structure en D-loop, telle que requise lors de la réinstallation d'une fourche de réplication déstabilisée ou lors de la réplication iSDR. Au contraire, sa dépendance à la transcription et sa sensibilité à la RNase HI propose plutôt une structure en R-loop. Pendant la transcription, le transcrit d'ARN peut s'hybrider avec son brin d'ADN complémentaire derrière l'ARN polymérase et ainsi former un R-loop. Cette hybridation peut être facilitée par l'activité recombinase de *RecA*. Dans une souche sauvage, le R-loop est reconnu par la RNase HI et l'ARN de celui-ci est dégradé. Ceci permet aux brins d'ADN de se réhybrider ensemble. En absence de la RNase HI, tel que chez le mutant *rnhA*, le R-loop se stabilise et se maintient dans le génome, formant ainsi un site *oriK*. L'extrémité 3' de l'ARN du R-loop est allongée par l'ADN polymérase qui synthétise de l'ADN sur une petite distance. Les protéines primosomales, telles que *PriA* et *PriB*, reconnaissent l'extrémité 3'OH de la rallonge d'ADN, forment le primosome puis chargent l'hélicase *DnaB* et la primase *DnaG*. Ensemble, ces protéines installent la fourche réplivative et il y a synthèse des brins continus et discontinus. L'ADN polymérase I reconnaît l'extrémité 3'OH du brin discontinu et la rallonge via son activité 5'-3' polymérase. Encore une fois, cette extrémité 3'OH est reconnue par les protéines primosomales et il y a assemblage d'une seconde fourche réplivative de l'autre côté du R-loop. L'établissement de cette deuxième fourche permet la réplication bidirectionnelle au site *oriK*. Pendant ce temps, une seconde ADN polymérase I enlève l'ARN du R-loop par son activité 5'-3' exonucléase. Ce modèle émis par Kogoma(147) supporte les caractéristiques de la réplication cSDR.

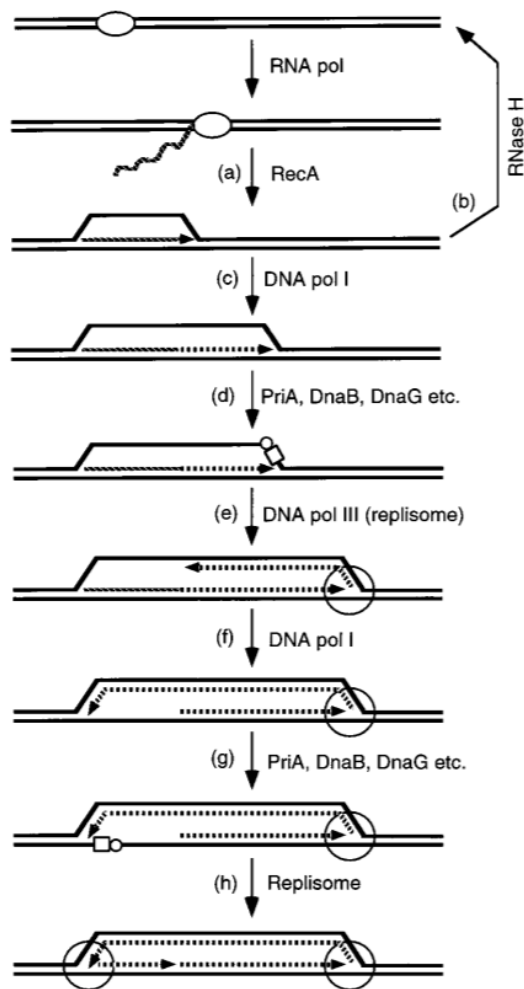


Figure 11. Schéma d'initiation de la réplication cSDR (147)

*Formation du R-loop pendant la transcription via l'hybridation du transcrite d'ARN avec son brin d'ADN complémentaire, aidé par l'activité recombinase de RecA. En absence de RNase HI, le R-loop se stabilise et est rallongé par l'ADN polymérase I. Formation du primosome puis installation de la fourche réplivative. Une seconde ADN polymérase I allonge le brin discontinu nouvellement synthétisé alors qu'une troisième dégrade l'ARN de l'hybride ARN-ADN. Les protéines primosomales reconnaissent la nouvelle extrémité 3'OH et installent une seconde fourche réplivative, permettant la réplication bidirectionnelle.*

## **Le cSDR et les topoisomérases de type 1A**

Des évidences génétiques récentes supportent l'implication des topoisomérase 1A dans la réplication cSDR(86). En effet, l'importance de la topoisomérase I dans la relaxation de

l'ADN est grandement reconnue. Cette fonction a été démontrée comme étant particulièrement essentielle pendant la transcription afin d'éviter la dénaturation des brins d'ADN derrière l'ARN polymérase et de faciliter l'hybridation du transcrit avec son brin d'ADN complémentaire. Des résultats *in vivo* et *in vitro* démontrent la formation de R-loops en absence de *topA*(44). La présence de cSDR dans le mutant *topA* demeure incertaine, puisqu'elle n'a jamais été mesurée directement. La délétion des deux Topos 1A engendre des défauts de ségrégation et de filamentation qui peuvent être corrigés par la sur-expression de la RNase HI ou la délétion de *dnaT*(86). Sachant que la RNase HI possède une fonction importante dans la dégradation des R-loops, que les R-loops peuvent servir d'origine de réplication cSDR et que DnaT possède potentiellement une fonction comme protéine primosomale dans le cSDR, ces évidences génétiques suggèrent la présence de réplication cSDR en absence de Topos 1A. Cependant, ce type de réplication n'a jamais été détecté directement ni mesuré précisément dans ce double mutant. Cette amplification des défauts du mutant *topA* en absence de *topB* apporte plusieurs questionnements concernant le rôle de la Topo III dans le cSDR. *In vitro*, il a été démontré que les R-loops sont des «hot spots» pour la Topo III(55), cependant le mutant *topB* ne démontre pas de phénotypes évidents dans des conditions de laboratoire(50).

## Objectifs et hypothèses

Mon projet de maîtrise a pour objectif de caractériser l'implication des topoisomérases de type 1A dans la régulation de la réplication à partir des R-loops. Pour y parvenir, j'ai développé une nouvelle technique plus précise et rapide qui permet la détection de la réplication cSDR *in vivo*. En effet, les procédés antérieurs employant la [H<sup>3</sup>]-thymine donnent des informations au niveau d'une population seulement et nécessitent un background génétique précis pour son utilisation, ce qui est très limitant.

Des évidences génétiques démontrent que les défauts de ségrégation, de croissance et de filamentation dans une souche déficiente en topoisomérase 1A proviennent du cSDR. De plus, la surexpression de la RNase HI dans le mutant *topA* corrige partiellement sa croissance, ce qui suggère des évènements de cSDR également en absence de la Topo I. Ici, je tenterai de mieux comprendre le rôle de la Topo III dans le cSDR. Une souche déficiente en Topo III



n'exprime pas de phénotypes particuliers en conditions de laboratoire, mais des résultats *in vitro* ont démontré sa capacité d'agir sur les R-loops. Ainsi, je suppose que le gène *topA* agit dans la régulation du cSDR en enlevant les R-loops. Cependant, puisque la Topo III se retrouve en faible concentration dans la cellule, comparativement à la Topo I, je crois qu'elle n'est pas aussi importante que la Topo I dans la régulation de la réplication à partir des R-loops.

## **Chapitre 2 : Article I**

**Constitutive stable DNA replication in *Escherichia coli* cells lacking type 1A topoisomerase activity.**

**Titre courant : Les topoisomérases 1A dans la réplication alternative de l'ADN**

Makisha Martel, Aurélien Balleydier, Alexandre Sauriol et Marc Drolet\*.

**Mots clés :** R-loop, Topoisomérase, *topA*, *topB*, *rnhA*, RNase H

## Contributions

Pour les études menées dans cet article, j'ai réalisé les résultats du développement de la nouvelle technique présentée dans la figure 2. Ces résultats sont essentiels pour démontrer le bon fonctionnement de la procédure avec une souche sauvage (contrôle négatif au cSDR) et un mutant *rnhA* (contrôle positif au cSDR). J'ai également effectué les résultats de la figure 4 qui montre l'implication des topoisomérases de type 1A dans la réplication cSDR. Finalement, j'ai aussi réalisé les résultats de la figure 6. Ces résultats sont importants pour démontrer que la délétion de *topB* n'affecte pas la morphologie ni le contenu d'ADN d'un mutant *rnhA*. Ce résultat était essentiel afin de mieux cibler le rôle de *topB* dans les problèmes de ségrégation et de croissance dans le mutant *topA* et d'ainsi vérifier la présence ou non d'un lien avec le cSDR.

## Abstract

Type 1A topoisomerases (topos) are ubiquitous enzymes involved in supercoiling regulation and in the maintenance of genome stability. *E. coli* possesses two type 1A enzymes, topo I (*topA*) and topo III (*topB*). Cells lacking both enzymes form very long filaments and have severe chromosome segregation and growth defects. We previously found that RNase HI overproduction or a *dnaT::aph* mutation could significantly correct these phenotypes. This leads us to hypothesize that they were related to unregulated replication originating from R-loops, i.e. constitutive stable DNA replication (cSDR). cSDR, first observed in *rnhA* (RNase HI) mutants, is characterized by its persistence for several hours following protein synthesis inhibition and by its requirement for primosome components, including DnaT. Here, to visualize and measure cSDR, the incorporation of the nucleotide analog ethynyl deoxyuridine (EdU) during replication in *E. coli* cells pre-treated with protein synthesis inhibitors, was revealed by “click” labeling with Alexa Fluor<sup>®</sup> 488 in fixed cells, and flow cytometry analysis. cSDR was detected in *rnhA* mutants, but not in wild-type strains, and the number of cells undergoing cSDR was significantly reduced by the introduction of the *dnaT::aph* mutation. cSDR was also found in *topA*, double *topA topB* but not in *topB* null cells. This result is consistent with the established function of topo I in the inhibition of R-loop formation. Moreover, our finding that *topB rnhA* mutants are perfectly viable demonstrates that topo III is not uniquely required during cSDR. Thus, either topo I or III can provide the type 1A topo activity that is specifically required during cSDR to allow chromosome segregation.

*Keywords:* R-loop, topoisomerase, topA, topB, rnhA, RNase H

## Introduction

In all cells, replication initiation is a highly regulated process occurring at defined replication origins and at a precise time during the cell cycle (1). In bacteria, the binding of the initiator protein DnaA to specific sequences within *oriC*, the replication origin, is the first step of this process (2). This is followed by DNA opening, helicase loading and finally replisome assembly for bi-directional replication (3, 4). Replication terminates when the two converging replication forks merge in the terminus region of the circular chromosome (5). In *E. coli*, the initiation of each new round of replication requires *de novo* protein synthesis, presumably for the cell to accumulate the required amount of the active form of the initiator protein (DnaA-ATP), for DNA opening at *oriC* (6). Not surprisingly, the DnaA/*oriC* system is normally required for bacterial viability.

Early work showed that replication initiation could also take place outside the normal *oriC* region (7). To understand why the initiation of new rounds of replication requires *de novo* protein synthesis in *E. coli*, mutants that maintain DNA synthesis for several hours despite the absence of protein synthesis were isolated. These mutants were named constitutive stable DNA replication (cSDR) mutants (7, 8). One of them, *sdrA224*, was found to map in the *rnhA* gene, encoding RNase HI (9). Moreover, the DnaA/*oriC* system was shown to be dispensable in *rnhA* mutants (9). In parallel to the *in vivo* work, RNase HI was isolated as a specificity factor to inhibit replication initiation outside *oriC* that could occur in an *in vitro* reconstituted system for *oriC*-dependent replication (9). It was hypothesized that R-loops presumably formed during transcription could persist long enough in the absence of RNase HI to be used as replication origins. Thus, *rnhA* mutants most likely replicate their entire chromosome from R-loops in the absence of the DnaA/*oriC* system.

cSDR requires transcription, RecA, PolII and the PriA-dependent primosome including PriB and likely DnaT ((7, 10, 11) and Fig. 1). R-loop formation is thought to occur co-transcriptionally by the re-annealing of the nascent RNA with the template DNA strand behind the moving RNA polymerase (12, 13). This process may be facilitated by an inverse strand exchange reaction performed by RecA (14, 15). RecA may also participate in cSDR by binding to ssDNA to stabilize the R-loop. Negative supercoiling that promotes DNA opening, and the G-richness of the non-template DNA strand are major contributors to R-loop

formation (16, 17). In cSDR, PolII is thought to extend the RNA of the R-loop to generate a structure similar to a D-loop, a substrate for PriA binding (7). cSDR uses the same replicative helicase (DnaB) and replisome components (pol III) as replication from *oriC*, but uses the PriA-dependent primosome for replicative helicase loading (7). This primosome is also used to restart replication when a replicative stress has led to replisome disassembly (18). cSDR is initiated from multiple origins named *oriKs* (19) but attempts to clone or to precisely locate them so far have been unsuccessful (20, 21). This may be due to the fact that R-loop formation and thus cSDR initiation may occur at many different *loci* on the chromosome of *E. coli* (22). These origins could be very weak individually and many of them could be randomly activated in a population of cells undergoing cSDR (23).

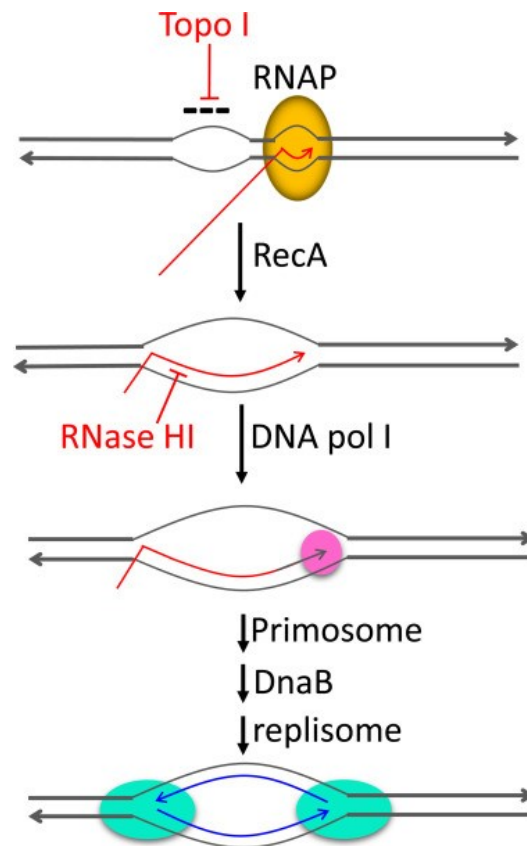


Figure 1. Model for constitutive stable DNA replication (cSDR).

*Topo I* prevents R-loop formation by relaxing transcription-induced negative supercoiling behind the moving RNAP. RNase HI acts by degrading the RNA moiety of the R-loop. See text for details.

Although research on cSDR has been very useful in understanding the interplay between transcription, recombination and replication, its biological significance has remained elusive. However, a recent report has shown that replication from R-loops initiates DNA breakage and genome instability (mutations and DNA amplification) in non-growing wild-type *E. coli* cells (24). This may suggest an important role of cSDR in the genetic adaptation of bacterial cells to stressful conditions. Interestingly, replication from R-loops in the ribosomal DNA locus of yeast cells has just been demonstrated (25). This constitutes the first demonstration of unregulated replication from R-loops in eukaryotic cells. Furthermore, the authors suggested that such replication could potentially contribute to copy number variation, which is highly relevant to carcinogenesis. Thus, unregulated replication from R-loops may be one additional way by which R-loops could affect the integrity of the genome in all living organisms (26, 27).

DNA topoisomerases (topos) are enzymes that solve the topological problems associated with replication, transcription and recombination (28). Enzymes of the type 1A family are essential and ubiquitous, being found in bacteria, archaea and eukarya. They require single-stranded DNA (ssDNA) regions for binding and they are involved in supercoiling regulation and in genome maintenance (29). *E. coli* cells lacking topo I (*topA*), the prototype enzyme of this family and the first topo to be discovered, barely grow (30) and tend to accumulate compensatory mutations that often map in either *gyrA* or *gyrB* genes (31, 32). Such mutations affecting gyrase activity reduce the chromosome negative supercoiling level below that of wild-type cells (31). A major function of *E. coli* topo I is the relaxation of transcription-induced negative supercoiling to suppress R-loop formation that may otherwise lead to hypernegative supercoiling and the inhibition of gene expression (12, 16, 33).

Topo III, the other type 1A enzyme in *E. coli*, plays no role in negative supercoiling relaxation *in vivo* and is thought to act as a decatenase during replication (34, 35). Topo III is encoded by *topB* and *topB* null mutants grow normally and display no obvious phenotypes under laboratory conditions (36). In addition, based on genetic evidence and similar to eukaryotic type 1A topos, it has been proposed that both topo I and III can act with RecQ helicase to resolve recombination intermediates (11, 37). Moreover, R-loops have been shown to be hot-spots for DNA relaxation by topo I and III *in vitro* (38, 39). *E. coli* cells lacking both type 1A enzymes have severe chromosome segregation defects and form very long filaments

(40). This may indicate that topo I and III share an important function in chromosome segregation *in vivo*. Our recent results suggest that this function is somehow related to cSDR (11). Indeed, either RNase HI overproduction or a *dnaT::aph* suppressor mutation was shown to significantly correct the strong phenotypes of double *topA topB* null mutants (11).

In this work, to further characterize the role of type 1A topoisomerases in genome maintenance, more specifically their involvement in cSDR regulation, we have used a procedure allowing us to visualize and measure cSDR in fixed cells under non-denaturing conditions. Using this procedure, we demonstrate the occurrence of cSDR in *topA*, double *topA topB* but not in *topB* null mutants. These results indicate that topo I, but not topo III, inhibits cSDR, likely by preventing R-loop formation. Furthermore, the finding that *topB rnhA* double mutants are perfectly viable and behave like single *rnhA* mutants, suggests that the lack of topo III activity behind the replication fork does not contribute to the strong cSDR-related phenotypes of double *topA topB* mutants. Rather, we believe that the high incidence of converging replication forks due to cSDR may reveal an important role for type 1A topoisomerases, either topo I or III, in replication termination. We propose that type 1A topoisomerases unlink the un-replicated parental DNA strands just before the merging of convergent replication forks at the termination step, to prevent over-replication due to forks passing each other (41, 42). This unscheduled replication may lead to chromosome segregation defects with the formation of highly filamentous cells. Thus, by acting at different steps during replication, type 1A topoisomerases preserve genome integrity.



## Materials and methods

### Bacterial strains and plasmids

Bacterial strains used in this study are all derivatives of *E. coli* K12 and are listed in Table 1. Details on their source as well as the list of plasmids used in this study are also given in Table 1. Transductions with P1*vir* were performed as described previously (43). PCR was used to confirm that the expected gene transfer occurred in the selected transductants.

Tableau I. *E. coli* strains and plasmids used

Name	Genotype or Relevant Genotype	Reference or Source
JW1752-1	<i>ΔtopB761::kan</i>	(44)
MM72	<i>rnhA::cam ΔtopB761::kan</i>	VU19 x P1(JW1752-1)
PH379	<i>rpsL galK2 ΔtrpE rnhA::cam</i>	(45)
RFM443	<i>rpsL galK2 Δlac74</i>	(33)
RFM475	<i>rpsL galK2 gyrB221 (Cou<sup>r</sup>) gyrB203(Ts) Δlac74 Δ(topA cysB)204</i>	(33)
VU19	RFM443 <i>rnhA::cam</i>	Lab collection
VU190	PH379 <i>dnaT::aph</i>	(11)
VU294	RFM475 pEM001	This work
VU296	RFM475 pEM003	This work
VU421	<i>rpsL galK2 gyrB221 (Cou<sup>r</sup>) gyrB203(Ts) Δlac74 ΔtopB topA20::Tn10</i> VU421 pSK760	(11)
VU422	VU421 pSK762c	(11)
VU425	pACYC184-derivative constructed from pSK760	(11)
pEM001	pSK760	(46)
pEM003	pACYC184-derivative constructed from pSK762c	(46)
pSK760	pBR322-derivative, <i>rnhA</i> gene with its own promoter	(33)
pSK762c	pBR322-derivative, like pSK760 but <i>rnhA</i> is mutated and inactive	(33)

### EdU incorporation and click-labeling

EdU incorporation and click-labeling using the “Click-It<sup>®</sup> Alexa Fluor 448<sup>®</sup> Imaging kit” (Life technologies, molecular probes) were done as described previously (47) with the following modifications. The cells were grown in LB medium at 37°C, unless otherwise

indicated, to an OD<sub>600</sub> of 0.3. EdU incorporation was for 60 min and to detect cSDR the cells were treated for 2 hours with spectinomycin at the indicated concentration (see Fig. legends) before EdU incorporation for 60 min. We found that reducing by half the amount of EdU (15 µg/ml instead of 30 µg/ml) did not affect the results (not shown). Thus, the amount of EdU was not a limiting factor in our experiments. The labeled cells were analyzed in flow cytometry or visualized by microscopy (see 2.3 and 2.4). All the experiments were performed at least two times.

### **Flow cytometry analysis**

The labeled cells were analyzed (at least 10 000 events per sample) with a BD FACSCanto™ II apparatus. The side scatter (SSC) **threshold was set** at 200 to eliminate as much background noise as possible. The experiments were performed with gates in order to minimize variations from one sample to another within the same experiment. Data were analyzed by using the BD FACSDiva™ software (BD Biosciences).

### **Microscopy**

Three microliters of concentrated Alexa Fluor 488-labeled cells were spotted on slides pre-treated with a Poly-L-Lysine (Sigma-Aldrich) solution and allowed to air dry at room temperature. One drop of Prolong Diamond Antifade Mountant (Life technologies, Molecular Probes) was deposited on the slides and sealed with a cover glass. Pictures (fluorescence (Alexa Fluor 488) and DIC) were randomly taken with a Nikon TE2000U microscope equipped with a CoolSnap fx 12 bits CCD camera (Photometrics). The GFP filter and an exposure time of 1 s was used for image acquisition. The images were processed using the Image J software.

DAPI stained cells were prepared as described previously (43). Pictures were randomly taken and the images analyzed as described above.

## Results

### A flow cytometry-based procedure to detect cSDR

A simple genetic test is commonly used to obtain evidence for the occurrence of cSDR in bacterial strains. In this test, the ability of a mutation to allow the growth of a *dnaA*(Ts) strain at the non-permissive temperature is evaluated (e.g. (48)). However, this procedure does not provide direct evidence for the occurrence of cSDR and, most of all, is only valid if the mutation gives the ability to the *dnaA*(Ts) strain to fully replicate its chromosome. So far, despite the demonstration of cSDR in *rnhA*, *recG* (49) and *topA* (see 3.3) mutants, it is only in single *rnhA* mutants that a functional DnaA/*oriC* system has been shown to be dispensable (In *recG* mutants, additional mutations in Tus and RNA polymerase are required for the cells to survive in the absence of the DnaA/*oriC* system (50)). To our knowledge, the only procedure that has been used to directly demonstrate cSDR consists in measuring [<sup>3</sup>H]thymine incorporation in a population of cells first treated with protein synthesis inhibitors. However, this procedure, used to define and demonstrate cSDR for the first time (8, 9), requires the use of strains with specific genetic backgrounds and, more importantly, it necessitates cell lysis and DNA extraction, and so gives the average [<sup>3</sup>H]thymine incorporation level in a population of cells.

We have adapted a previously described procedure (47) to demonstrate cSDR at the cellular level (Fig. 2A). In our procedure, protein synthesis is first inhibited with spectinomycin for two hours. Replication from the normal replication origin (*oriC*) is known to be completed after two hours of protein synthesis inhibition (51). Next, EdU (5-ethynyl-2'-deoxyuridine), an analog of thymidine, is incorporated *in vivo* and after one hour, the cells are fixed and permeabilized. Then, the Alexa Fluor<sup>®</sup> 488 dye is conjugated to the EdU moiety by using the click-it reaction that does not require prior DNA denaturation, in contrast to BrdU. Finally, cells are analyzed for EdU incorporation (cSDR) by using flow cytometry.

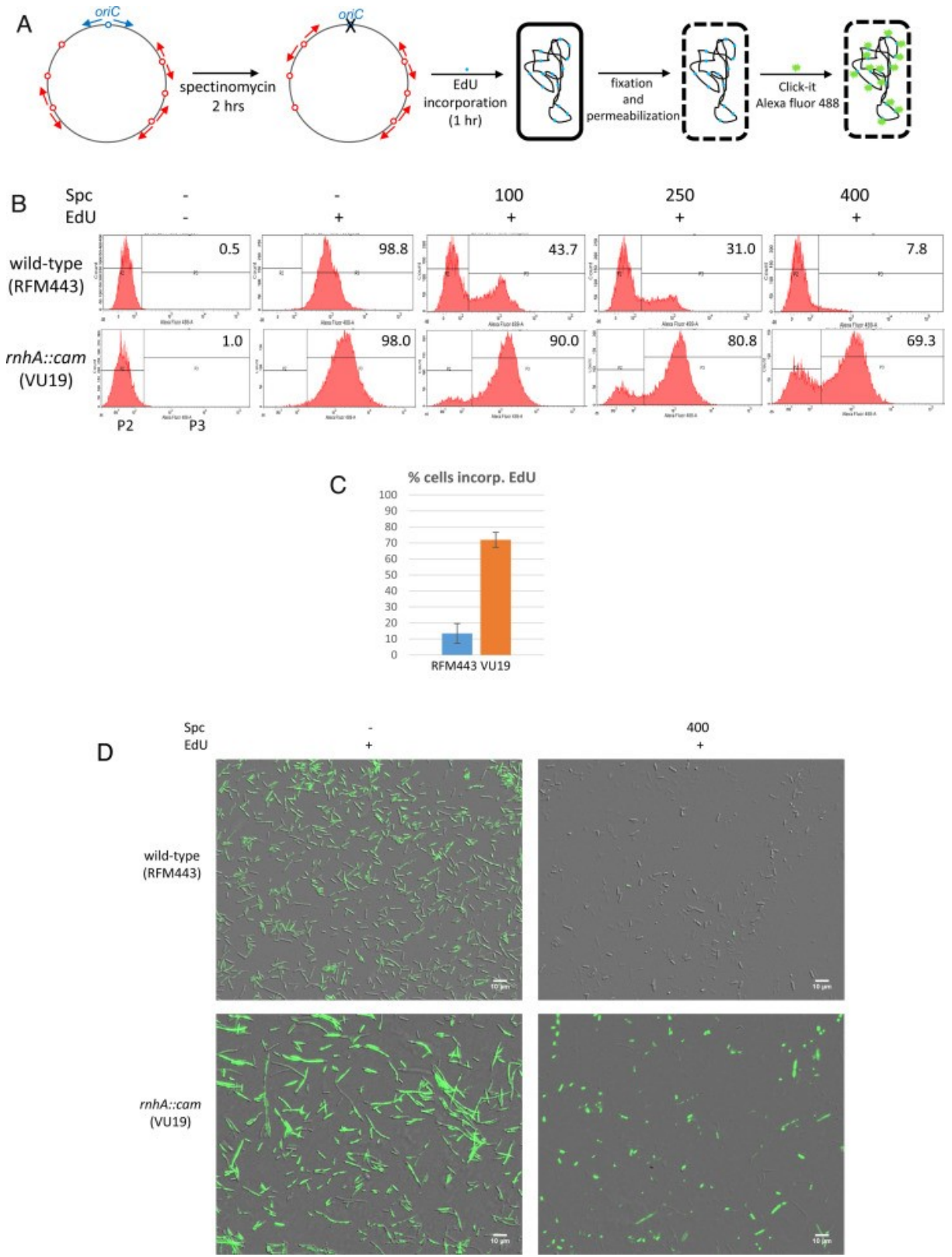


Figure 2. cSDR in *rnha* null but not in wild-type cells.

(A) Schematic representation of the procedure used in this work to detect cSDR. Wild-type (RFM443) and *rnhA::cam* (VU19) cells were grown for EdU incorporation and prepared for flow cytometry analysis (B and C) and microscopy (D) as described in 2.2, 2.3 and 2.4 In (B), the no EdU cell samples (left panels) were used to define the background (P2 zone; non-specific binding of Alexa Fluor<sup>®</sup> 488 dye to the cells). The number in the upper right corner of the panels give the percentage of cells incorporating EdU (cells in the P3 zone). The histogram in (C) shows the results of 4 independent experiments in which wild-type (RFM443) and *rnhA::cam* (VU19) cells were treated with spectinomycin at 400 µg/ml before EdU incorporation. (D) Representative merged images of DIC and fluorescence (Alexa Fluor<sup>®</sup> 488 dye) pictures.

We first determined the concentration of spectinomycin required for replication to be completed in wild-type cells after two hours of exposure to the inhibitor. In Fig. 2B and for the other flow cytometry results presented in this paper, the P2 and P3 zone represents respectively the cells not replicating (non-specific binding of Alexa Fluor<sup>®</sup> 488 dye to the cells; the background) and actively replicating their DNA. It can be seen that more than 98% of the wild-type cells (RFM443) were actively replicating their DNA in the absence of spectinomycin (wild-type, second panel; +EdU, -Spc, 98.8% of the cells in P3). The proportion of such cells significantly decreased as the concentration of spectinomycin was increased, to reach less than 8% at the highest concentration (wild-type, last panel; +EdU, +Spc at 400 µg/ml, 7.8%). Thus, at 400 µg/ml of spectinomycin, replication was fully completed in nearly all cells. This also corresponds to the spectinomycin concentration that immediately and completely arrested growth (not shown).

In the case of the *rnhA::cam* strain (VU19), nearly 70% of the cells were still replicating their DNA after two hours of exposure to the highest concentration of spectinomycin (Fig. 2B; *rnhA::cam*, last panel; +EdU, +Spc at 400 µg/ml, 69.3%). The experiments with RFM443 and VU19 strains were repeated four times and gave very similar results as shown in Fig. 2C. Fluorescence microscopy was also used to visualize EdU incorporation in fixed cells (Fig. 2D). In good agreement with the flow cytometry results, we found that after two hours of exposure to spectinomycin at 400 µg/ml very few wild-type cells (less than 5%) were still replicating their DNA, whereas over 50% of the *rnhA::cam* cells were

still active (+EdU, +spc at 400 µg/ml). Thus, our results are in agreement with those of the late Kogoma's group (9) and demonstrate cSDR at the cellular level in an *rnhA* mutant.

### **A *dnaT::aph* mutation reduces cSDR**

In a screen for suppressors of the growth defect of a double *topA rnha* mutant, we recently isolated a *dnaT::aph* mutation (11). As this gene codes for a member of the primosome, DnaT, we suspected that the mutation inhibited or at least significantly reduced cSDR. In agreement with this hypothesis, we found that the *dnaT::aph* mutation eliminated the ability of an *rnha* null mutant to allow the growth of a *dna(Ts)* strain at the non-permissive temperature (11). Furthermore, the *dnaT::aph* mutation significantly corrected the growth and chromosome segregation defects of a double *topA topB* mutant (11). Here, we used our flow cytometry assay to more directly demonstrate the effect of this suppressor mutation on cSDR. Fig. 3 shows that the *dnaT::aph* mutation considerably reduced the proportion of cells undergoing cSDR in an *rnhA::cam* mutant. Indeed, 58.4% and 29.6% of the cells were still actively replicating their DNA after two hours of exposure to spectinomycin at 400 µg/ml, respectively for the *rnhA::cam* (PH379) and the *rnhA::cam dnaT::aph* (VU190) strains (+EdU, +spc at 400 µg/ml). Our assay also allowed us to evaluate the relative efficiency of cSDR in our strains by comparing the average EdU incorporation level per cell (average Alexa Fluor value per cell in P3) for cells treated with spectinomycin to that of cells not exposed to this drug. We found cSDR to be 2 and more than 4 times less efficient than replication from DnaA/*oriC*, respectively in the *rnhA::cam* (PH379) and the *rnhA::cam dnaT::aph* (VU190) strains. The result for our *rnhA::cam* strain is in good agreement with an earlier report showing that cells replicating their DNA via cSDR had approximately a twofold decreased DNA content as compared to cells replicating DNA from *oriC* (52). Thus, the *dnaT::aph* mutation reduced the ability of the *rnhA::cam* strain to replicate its DNA via cSDR, in terms of both the number of cells undergoing cSDR and the level of cSDR per cell.

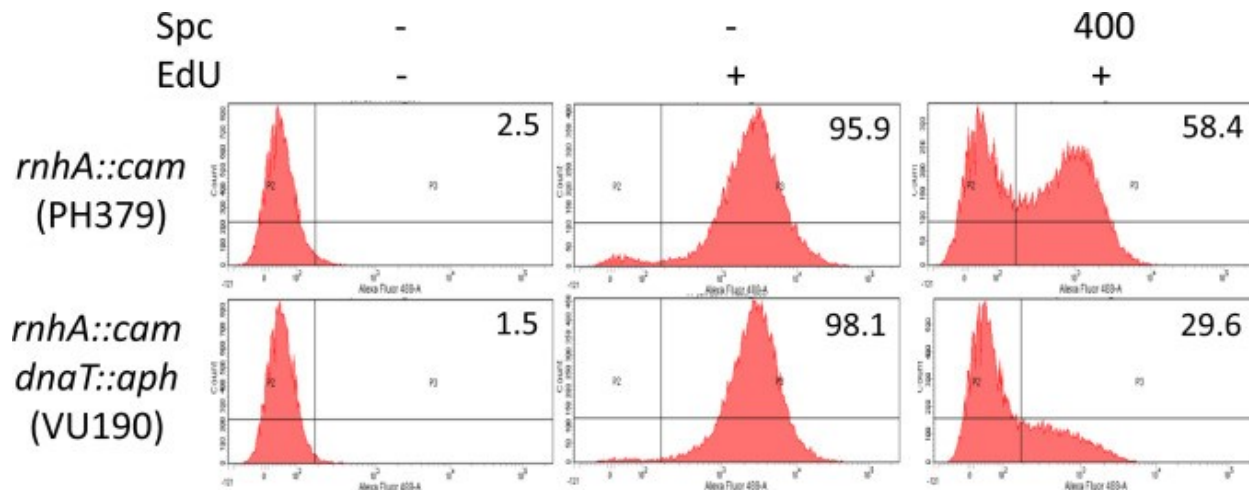


Figure 3. cSDR in The *dnaT::aph* *rnhA* mutant

The *dnaT::aph* mutation inhibits cSDR in an *rnhA::cam* strain. *rnhA::cam* (PH379) and *rnhA::cam* *dnaT::aph* (VU190) cells were grown and tested for cSDR as described in the legend to Fig. 2.

### cSDR in cells lacking both type 1A topos

As stated above, we recently obtained genetic evidence for cSDR being a major cause for the strong growth and chromosome segregation defects seen in double *topA topB* null mutants (11). Here, we used the EdU incorporation assay to detect cSDR in cells lacking both type 1A topos. Fig. 4A shows that 61.4% of the cells from a double *topA topB* null mutant were still replicating their DNA two hours following exposure to spectinomycin at 400  $\mu\text{g/ml}$  (right panel). This result confirmed the occurrence of SDR, but not necessarily cSDR, in cells lacking type 1A topos. Indeed, another kind of stable DNA replication, named iSDR and dependent on the DNA damage-inducible SOS response, has been described (7).

To identify the type of SDR occurring in the absence of type 1A topos, we used a pair of isogenic *topA topB* null strains carrying either pSK760 (VU422), a plasmid allowing RNase HI to be overproduced, or the control plasmid, pSK762c (VU425), with an inactivated *rnhA* gene. Moreover, to better appreciate the effect of RNase HI overproduction on SDR, we used various concentrations of spectinomycin as initially done for an *rnhA* mutant (Fig. 2B). Fig. 4B shows that the proportion of cells still replicating their DNA significantly decreased as the concentration of spectinomycin increased, reaching 18.1 % at the highest concentration when

RNase HI was overproduced (VU422, last panel; +EdU, +Spc at 400  $\mu\text{g/ml}$ , 18.1%). However, the real proportion of cells replicating their DNA is likely lower than that, as 13.8% of the cells were found in the P3 zone in the absence of EdU (VU422, first panel, the background). Presumably, longer cells bind non-specifically more Alexa Fluor dye than shorter, normal ones. When RNase HI was not overproduced (VU425), 67.1% of the cells were still replicating their DNA two hours after the spectinomycin treatment at the highest concentration (VU425, last panel; +EdU, +Spc at 400  $\mu\text{g/ml}$ , 67.1%). Three independent experiments were performed and gave very similar results as shown in Fig. 4C. Furthermore, Fig. 4C shows that the presence of a plasmid in the *topA topB* null strain had no effect *per se* on the proportion of cells incorporating EdU (compare VU421 (no plasmid) to VU425 (+pSK762c)).

Fluorescence microscopy was also used to visualize EdU incorporation in double *topA topB* null cells (Fig. 4D). In good agreement with the flow cytometry results, we found that after two hours of exposure to spectinomycin at 400  $\mu\text{g/ml}$ , very few *topA topB* null cells overproducing RNase HI (less than 3%) were still replicating their DNA, whereas over 50% of the *topA topB* null cells not overproducing RNase HI were still active (+EdU, +spc at 400  $\mu\text{g/ml}$ ). Thus, our results demonstrate the occurrence cSDR in cells lacking type 1A topos.



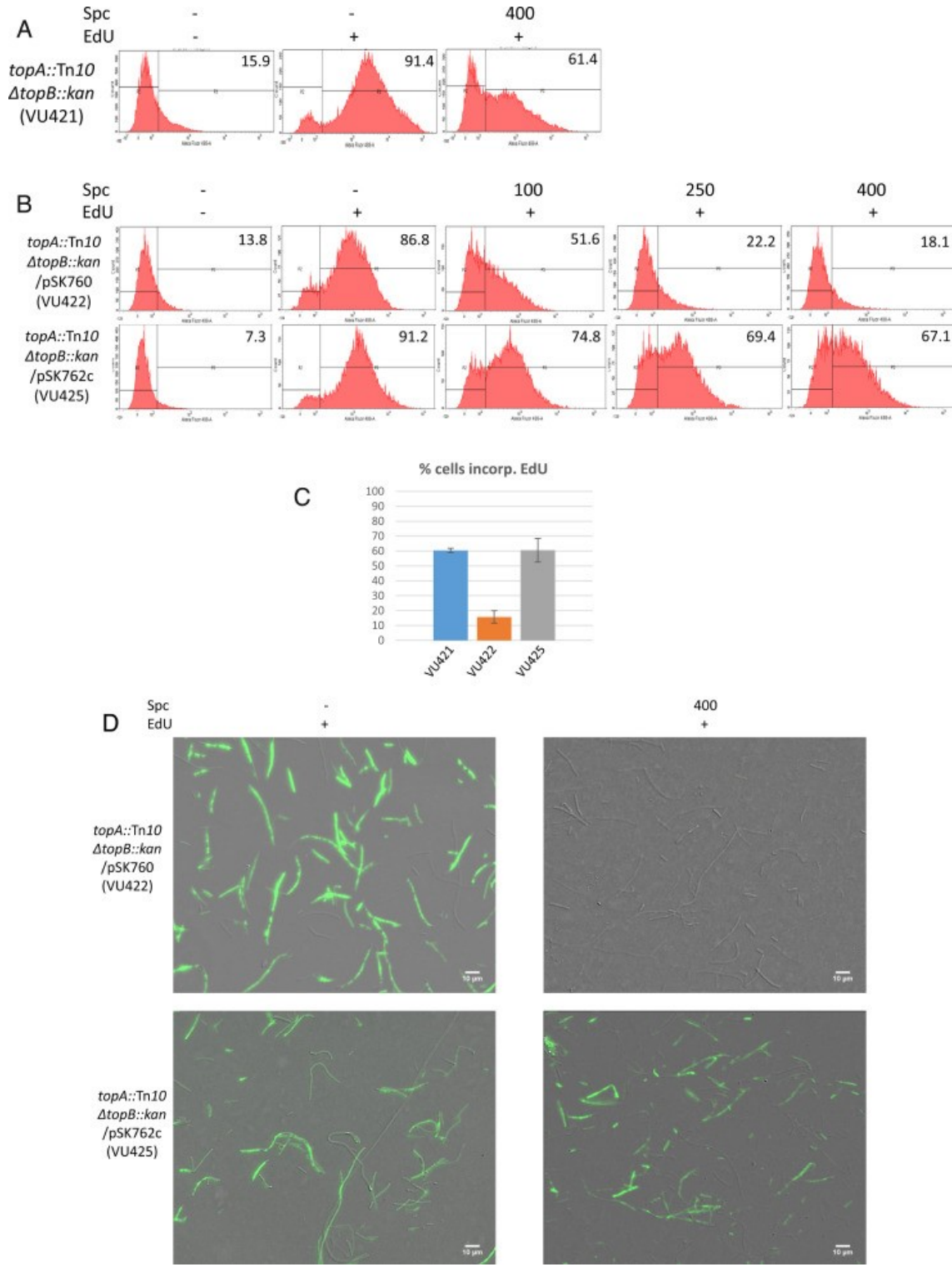


Figure 4. cSDR in cells lacking type 1A topoisomerases.

Cells were grown at 30°C and tested for cSDR as described in the legend to **Fig. 2**. (A) SDR in a *topA::Tn10 ΔtopB::kan* (VU421) strain. (B) RNase HI overproduction inhibits SDR in

*topA::Tn10 ΔtopB::kan* cells. (compare *topA::Tn10 ΔtopB::kan* cells overproducing (pSK760, VU422) or not overproducing (pSK762c, VU425) RNase HI). (C) shows the results of 3 independent experiments in which cells were treated with spectinomycin at 400 μg/ml before EdU incorporation. (D) Representative merged images of DIC and fluorescence (Alexa Fluor® 488 dye) pictures

### **cSDR in single *topA*, but not *topB*, mutant**

The observation that double *topA topB* null mutants, but neither single mutant, have severe chromosome segregation and growth defects suggested that topo I and III share an important function *in vivo* (40). Our results show that this common function is somehow related to cSDR. However, it is unlikely to be simply the inhibition of cSDR initiation since *rnhA* mutants that undergo high levels of cSDR grow very well and do not display major chromosome segregation defects (see 3.5).

To better understand the interplay between type 1A topoisomerases and cSDR, we first used the EdU assay to look for SDR in single *topA* and *topB* mutants. The results shown in Fig. 5A demonstrate the presence of SDR in *topA* null, but not *topB* null mutants. Indeed, whereas 43.9% of the *topA* null cells were still replicating their DNA following exposure to spectinomycin, only 3.7% of the *topB* null cells were active after the treatment with spectinomycin (+EdU, +Spc (400 μg/ml); compare *ΔtopA* (RFM475) and *ΔtopB::kan* (JW1752-1)).

Next, to look for cSDR in the absence of topo I, we used a pair of isogenic *topA* null strains carrying either pEM001, allowing RNase HI to be overproduced, or the control plasmid, pEM003, with an inactivated *rnhA* gene. Fig 5B shows that the proportion of cells still replicating their DNA after the spectinomycin treatment was much lower when RNase HI was overproduced (+EdU, +Spc (400 μg/ml); *ΔtopA*/pEM001, 8.4% and *ΔtopA*/pEM003, 49.5%). Thus, our results demonstrate the occurrence of cSDR in single *topA* null mutants. This is consistent with the role of topo I in the inhibition of R-loop formation. Furthermore, the existence of cSDR in cells lacking topo I would also explain the positive effect of the *dnaT::aph* mutation on the growth of *topA* null mutants and the low *ori/ter* ratio in these mutants (11). Indeed, *rnhA* and *recG* mutants, in which cSDR is taking place, have lower *ori/ter* ratio than wild-type cells (21, 50).

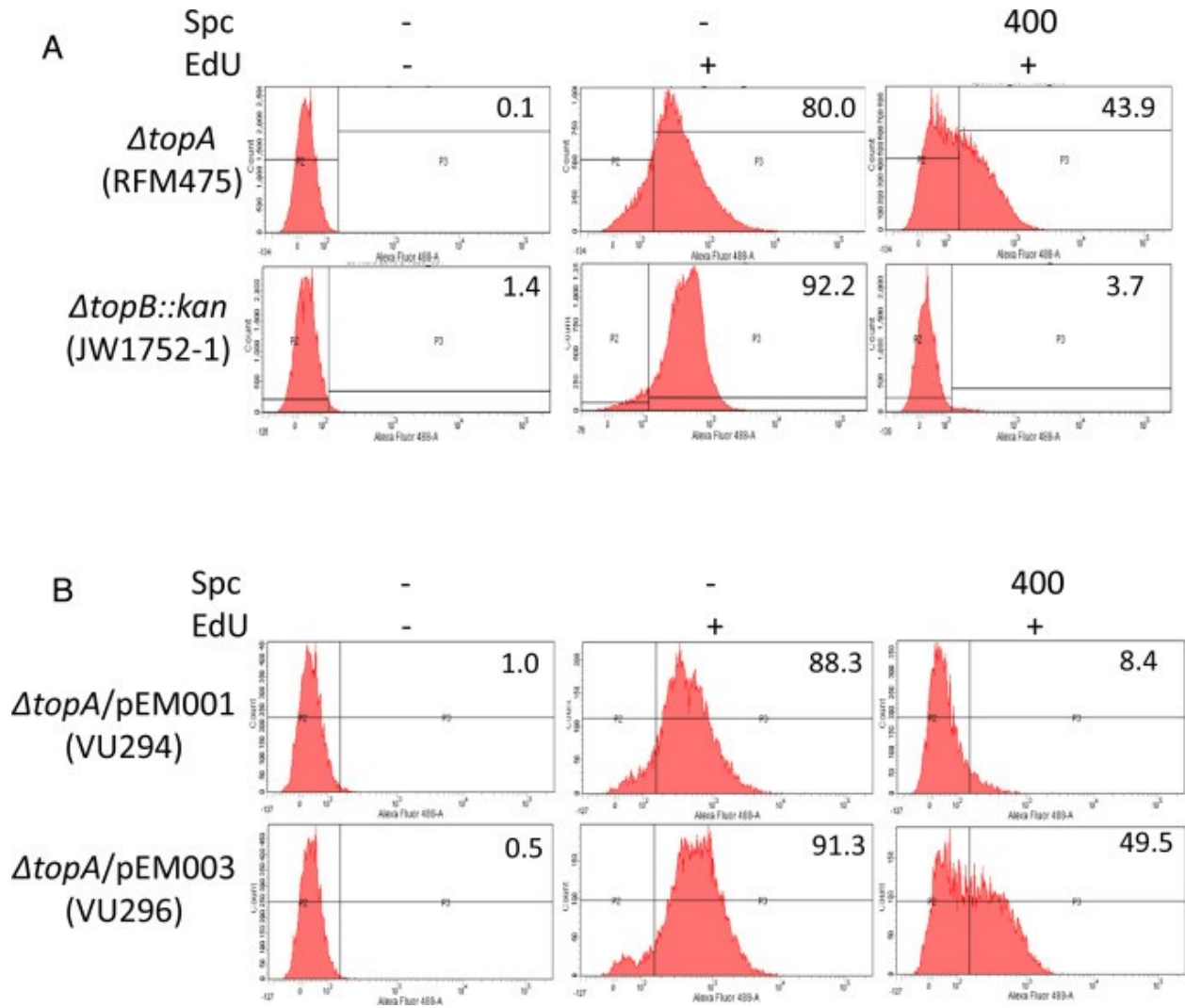


Figure 5. cSDR in *topA* null but not *topB* null cells.

Cells were grown and tested for cSDR as described in the legend to **Fig. 2**. (A) SDR in a *ΔtopA* (RFM475) but not in a *ΔtopB::kan* strain (JW1752-1). (B) RNase HI overproduction inhibit SDR in *ΔtopA* cells (compare *ΔtopA* cells overproducing (pEM001, VU294) or not overproducing (pEM003, VU296) RNase HI).

### Deleting *topB* has no effects on the growth, cell morphology and DNA content of an *rnhA* mutant

One function of topo III is to remove the precatenanes that form behind the fork during replication (35). We considered the possibility that this function might be uniquely required during cSDR. In this context, the strong phenotypes of double *topA topB* null mutants would

not be due to the lack of a specific type IA topo function, but rather to the absence of two specific functions, one for topo I, the inhibition of R-loop formation, and one for topo III, the removal of precatenanes during replication. If this was the case, the phenotypes of double *rnhA topB* null mutants should be at least as severe as those of double *topA topB* null mutants, since the level of cSDR is higher in *rnhA* mutants as compared to *topA* mutants. However, we found that introducing a  $\Delta topB::kan$  allele in an *rnhA* mutant was as easy as introducing it in a wild-type strain. Furthermore, the *rnhA::cam  $\Delta topB::kan$*  transductants grew as well as the single *rnhA::cam* mutant (not shown). Cells of wild-type (RFM443),  $\Delta topB::kan$  (JW1752-1), *rnhA::cam* (VU19) and  $\Delta topB::kan$  *rnhA::cam* (MM72) strains were stained with DAPI and prepared for microscopy for the examination of cell morphology and DNA content. Fig. 6 shows that cells of the  $\Delta topB::kan$  strain (JW1752-1) were almost identical to those of the wild-type strain (RFM443), both in terms of cell morphology and DNA content. The *rnhA::cam* strain (VU19) produced normal cells and short filaments with DNA that appeared to be more diffuse. Deleting *topB* in the *rnhA::cam* mutant (MM72,  $\Delta topB::kan$  *rnhA::cam*) had no significant effects on either cell morphology or DNA content, i.e. cells of the  $\Delta topB::kan$  *rnhA::cam* strain were indistinguishable from those of the *rnhA::cam* strain. Thus, the function of topo III in removing the precatenanes during replication is not especially required during cSDR. A function shared between topo I and III other than inhibiting replication from R-loops is therefore specifically required for chromosome segregation in cells undergoing cSDR.

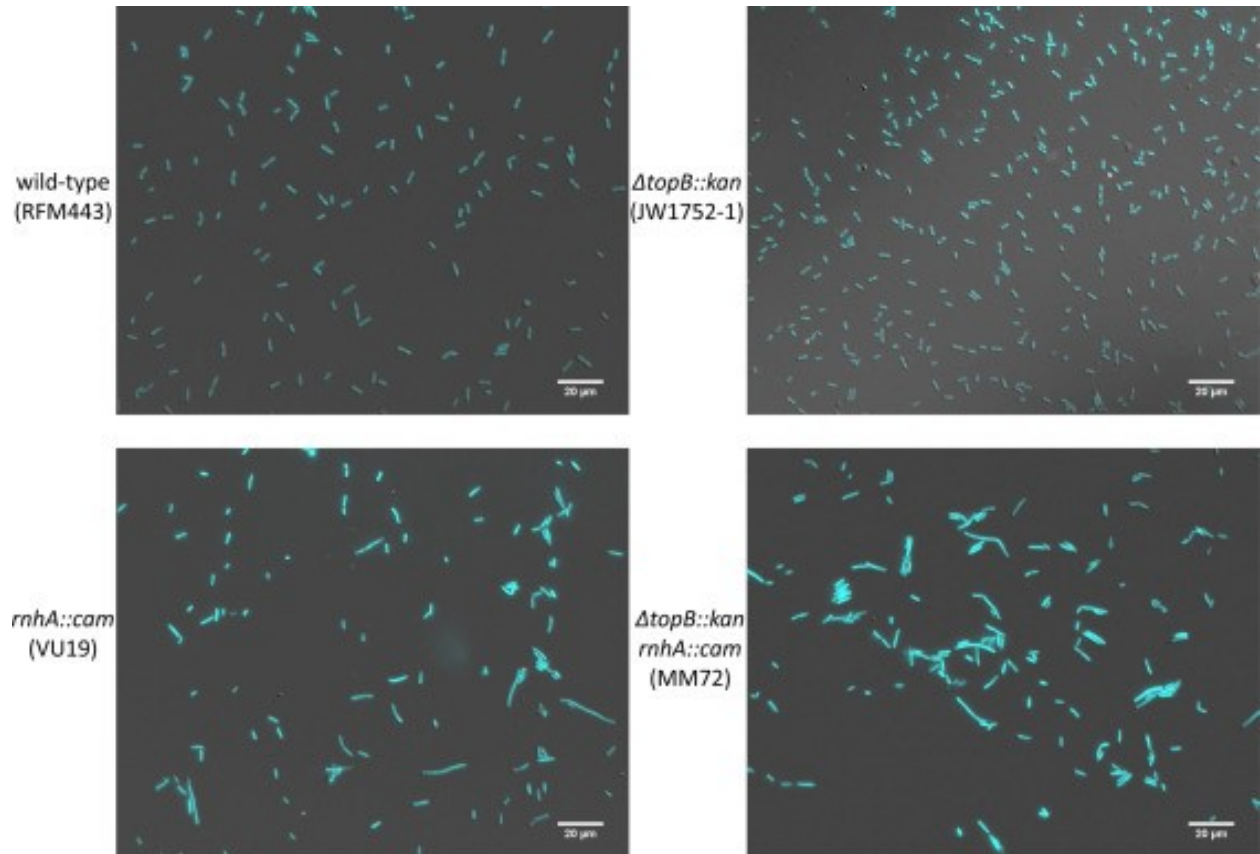


Figure 6. Deleting *topB* has no effect on cell morphology and DNA content of an *rnhA* mutant.

*Cells of wild-type (RFM443),  $\Delta topB::kan$  (JW1752-1),  $rnhA::cam$  (VU19) and  $\Delta topB::kan rnhA::cam$  (MM72) strains were grown and stained with DAPI and prepared for microscopy as described in 2.4. Representative merged images of DIC and fluorescence (DAPI) pictures are shown.*

## Discussion

### A new procedure to detect cSDR

In this work, we have developed a simple procedure to detect cSDR at the cellular level. Highly reproducible results could be generated. That cSDR was indeed detected is supported by the findings that EdU incorporation after two hours of spectinomycin treatment was still observed in various *rnhA* mutants, but not in wild-type strains. Moreover, EdU incorporation after the spectinomycin treatment was significantly reduced by the introduction of the *dnaT::aph* mutation in an *rnhA* mutant. It was also found that cSDR was about two times less efficient than replication from the DnaA/*oriC* system, a finding that was in agreement with an earlier report showing that *rnhA* null cells replicating their DNA via cSDR had two times less DNA than cells replicating from *oriC* (7, 52).

There has recently been a renewed interest in the study of cSDR, which can be attributed at least in part to the finding that R-loops are ubiquitous in organisms from bacteria to man, and that they can affect genome stability in many ways (26, 27). More specifically, replication from R-loops in an eukaryotic organism has just been reported (25). It has been suggested that such replication may contribute to copy number variation, which is relevant to carcinogenesis. Furthermore, evidence for replication from R-loops initiating DNA breakage and genome instability in non-growing wild-type *E. coli* cells has also been reported (24). Thus, cSDR is unlikely to be an alternative pathway to replicate the entire chromosome before cell division, but may contribute to stress-induced mutagenesis which is relevant to genome evolution. In this context, the observation that the DnaA/*oriC* system is dispensable in *rnhA* mutants should only be taken as an indication that the sites and maybe the frequency of R-loop formation turn out to be well-suited for full chromosome duplication in the absence of RNase HI. In fact, so far it is only in *rnhA* mutants that cSDR was shown to be able to duplicate the entire chromosome, without the need for additional mutations. Consequently, the genetic test using a *dnaA*(Ts) mutant is unlikely to be appropriate for the identification of genes involved in cSDR regulation (and hence in R-loop regulation). Instead, the flow cytometry assay described in this paper is certainly well-suited for this purpose.

## Function of topo I and topo III in cSDR.

The flow cytometry assay described in this work was initially developed as a tool to investigate for the occurrence of cSDR in cells lacking type 1A topoisomerases. We had previously found that either the overproduction of RNase HI or the introduction of a *dnaT::aph* mutation could significantly correct the severe growth and chromosome segregation defects of double *topA topB* null mutants, which suggested that these phenotypes were somehow related to cSDR (11). Here, by using the flow cytometry assay, we have confirmed that the *dnaT::aph* mutation considerably reduces cSDR. With this assay, we have also demonstrated the occurrence of cSDR in double *topA topB* null mutants, by showing that replication that persisted after two hours of exposure to spectinomycin could be inhibited by overproducing RNase HI. We also showed that cSDR occurred in single *topA* but not *topB* null mutants, which is consistent with the established function of topo I in inhibiting R-loop formation (12, 16). At this step, we considered the possibility that the topo III function in decatenation behind the replication fork (35) could be especially required during cSDR. However, our finding that deleting *topB* had no effect on the viability, cell morphology and DNA content of an *rnhA* mutant that undergoes high level of cSDR, excluded this possibility. Although it is possible that topo III plays a role in the inhibition of R-loop formation, at least when it is overproduced (39), the strong phenotypes of *topA topB* null mutants, that are largely related to cSDR, cannot be explained by evoking this putative role of topo III. Indeed, these phenotypes are not seen in single *topA* null and *rnhA null* mutants despite the fact that they have, respectively, a slightly lower or slightly higher level of cSDR as compared to *topA topB* null mutants. Moreover, *rnhA* mutants grow almost as well as wild-type cells. Thus, type 1A topoisomerases likely share a common function required for chromosome segregation, a function that is not directly related to cSDR, but that is especially required during cSDR.

Therefore, it appears that cells undergoing cSDR somehow require a type 1A topoisomerase activity for chromosome segregation. It does not seem to be related to decatenation *per se*, since topo IV can perform this task, and overproducing this enzyme did not correct the strong phenotypes of cells lacking type 1A topoisomerases ((40), Usongo and Drolet, unpublished results). In fact, the chromosome segregation defect seen in *topA topB* null mutants is very different from the classical one, the  $\text{Par}^-$  phenotype (53), in which the failure to fully decatenate the

duplicated chromosomes leads to the accumulation of elongated cells with a DNA mass at their center, and to the production of a large number of anucleate cells. Cells of double *topA topB* null mutants form very long filaments almost fully packed with DNA, and these mutants barely produce anucleate cells ((11), Usongo and Drolet, unpublished results). This may suggest that the strong chromosome segregation defect seen in cells lacking type 1A topoisomerase is related to over-replication.

Replication termination is one particular step of cSDR that may specifically require the activity of a type 1A topoisomerase to prevent over-replication. Over-replication has been shown to occur when convergent replication forks collide *in vitro* (41) and evidence has been recently provided for its occurrence *in vivo* as well, in the terminus region (42, 50). In fact, replication termination in *E. coli* is normally confined to this region, where convergent replication forks assembled at *oriC*, merge (5). Indeed, the binding of the Tus protein to *ter* sites restricts the merging of replication forks to the terminus region. Thus, any over-replication event occurring as a result of forks merging within the terminus region will be confined to this region.

Replication fork convergence is expected to be particularly frequent in cells that replicate their chromosome from both *oriC* and R-loops (cSDR). In fact, the use of whole genome approaches has recently revealed a significant increase in the copy number of sequences within the terminus region of *rnha* and *recG* mutants (21, 50). By using similar approaches, variations could be observed in the copy number of sequences within the terminus region of strains carrying mutations affecting the termination process (42). Likewise, despite over-replicating from *oriC*, *topA* mutants have a lower *ori/ter* ratio than normal cells, thus suggesting an increase in the copy number of sequences within the terminus region of cells lacking topoisomerase I (11). *recB* is one key gene that has recently been shown to be involved in the replication termination process (42). Furthermore, unlike the *recB*-dependent homologous recombination pathway, the termination process involving *recB* is *recA*-independent (42). Interestingly, double *topA recB* and *rnha recB* mutants are barely viable (11, 54), whereas the absence of *recA* has basically no effects on the growth of *rnha* mutants, and even improves the growth of *topA* mutants under certain circumstances (11, 55). In cells initiating replication from R-loops at various sites (cSDR) replication forks merging is also expected to occur outside the terminus region. As a result, over-replication will not be confined to the terminus region and may further lead to additional events of forks merging and over-replication. This



series of events can potentially have disastrous consequences on genome stability and chromosome segregation as well (50).

The involvement of type 1A topoisomerases in the termination process can best be explained in the context of the topological problem created by the convergence of two replication forks. Indeed, replication-induced positive supercoiling, normally removed by gyrase, becomes particularly problematic when convergent replication forks are about to meet at the *ter* region. Indeed not only a very high level of positive supercoiling accumulates, the space on the DNA template becomes too small to accommodate the binding of gyrase. At this stage, two alternative pathways can be used to complete replication (56, 57), while allowing the last intertwinings to be removed to fully decatenate the two replicated chromosomes. In the first pathway, replication is completed before the unravelling of the intertwined parental strands. As a result, the intertwined parental strands are converted to intertwinings between the newly replicated chromosomes (catenanes). These catenanes are removed by topoisomerase IV (58, 59). In the second pathway, unlinking of the parental DNA strands *precedes* their replication. In this pathway, a type 1A enzyme can bind to a single-stranded DNA region and unlink the parental strands (57). The remaining gaps on the two physically separated chromosomes might then be filled in by Pol I as previously proposed (5, 60). Thus, by unlinking the parental DNA strands just before the merging of the two replication forks, type 1A topoisomerases can prevent over-replication from occurring. This function might be especially important in cells undergoing cSDR and, therefore, the strong phenotypes of double *topA topB* null mutants can be very well explained in this context.

When the robust growth and chromosome segregation defects of double *topA topB* null mutants were first described, it was observed that deleting *recA* significantly corrected these phenotypes (40). The finding that these phenotypes were not corrected by the *lexA3* mutation or by a *sulA* mutation showed that the *recA* effect was not related to the SOS response (40). We have also observed the beneficial effect of deleting *recA*, but only when RNase HI overproduction was also shown to be able to correct these severe phenotypes (11). Indeed, the strong phenotypes of double *topA topB* null mutants when the activity of gyrase was severely compromised, were neither corrected by overproducing RNase HI nor by deleting *recA* (11, 43). These observations lead us to conclude that deleting *recA* and overproducing RNase HI acted in the same pathway. The results presented here suggest that this pathway is cSDR.

When gyrase activity is severely compromised, the decatenation activity of topo IV is much less efficient (61) and, as a result, type 1A topo activity is now required during replication, possibly including during the termination step.

Clearly, more work would be required to fully understand the involvement of type 1A topoisomerases in replication and in genome maintenance. One interesting possibility, among others, is that type 1A topo activity might be especially required in non-growing cells that may use replication fork stalling to generate mutations for adaptation to hostile environments (24).

## **Acknowledgments**

We thank Serge Sénéchal for assistance with flow cytometry, Monique Vasseur at the Département de Biochimie et médecine moléculaire, Université de Montréal for her help with microscopy and Patrick Hallenbeck for English editing. This work was supported by a Discovery Grant from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) to MD. AB and MM were supported by an Undergraduate Student Research Awards from the NSERC.

## References

1. Leonard AC, Mechali M. DNA replication origins. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 2013;5(10):a010116.
2. Leonard AC, Grimwade JE. The orisome: structure and function. *Frontiers in microbiology*. 2015;6:545.
3. Bell SP, Kaguni JM. Helicase loading at chromosomal origins of replication. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2013;5(6).
4. O'Donnell M, Langston L, Stillman B. Principles and concepts of DNA replication in bacteria, archaea, and eukarya. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 2013;5(7).
5. Duggin IG, Wake RG, Bell SD, Hill TM. The replication fork trap and termination of chromosome replication. *Mol Microbiol*. 2008;70(6):1323-33.
6. Leonard AC, Grimwade JE. Initiation of DNA Replication. *EcoSal Plus*. 2010;2010.
7. Kogoma T. Stable DNA replication: interplay between DNA replication, homologous recombination, and transcription. *Microbiol Mol Biol Rev*. 1997;61(2):212-38.
8. Kogoma T. A novel *Escherichia coli* mutant capable of DNA replication in the absence of protein synthesis. *J Mol Biol*. 1978;121(1):55-69.
9. Ogawa T, Pickett GG, Kogoma T, Kornberg A. RNase H confers specificity in the dnaA-dependent initiation of replication at the unique origin of the *Escherichia coli* chromosome in vivo and in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1984;81(4):1040-4.
10. Sandler SJ. Requirements for replication restart proteins during constitutive stable DNA replication in *Escherichia coli* K-12. *Genetics*. 2005;169(4):1799-806.
11. Usongo V, Drolet M. Roles of type 1A topoisomerases in genome maintenance in *Escherichia coli*. *PLoS Genet*. 2014;10(8):e1004543.
12. Masse E, Drolet M. *Escherichia coli* DNA topoisomerase I inhibits R-loop formation by relaxing transcription-induced negative supercoiling. *J Biol Chem*. 1999;274(23):16659-64.
13. Roy D, Yu K, Lieber MR. Mechanism of R-loop formation at immunoglobulin class switch sequences. *Molecular and cellular biology*. 2008;28(1):50-60.
14. Kasahara M, Cliekman JA, Bates DB, Kogoma T. RecA protein-dependent R-loop formation in vitro. *Genes & development*. 2000;14(3):360-5.
15. Zaitsev EN, Kowalczykowski SC. A novel pairing process promoted by *Escherichia coli* RecA protein: inverse DNA and RNA strand exchange. *Genes & development*. 2000;14(6):740-9.
16. Drolet M. Growth inhibition mediated by excess negative supercoiling: the interplay between transcription elongation, R-loop formation and DNA topology. *Mol Microbiol*. 2006;59(3):723-30.
17. Roy D, Lieber MR. G clustering is important for the initiation of transcription-induced R-loops in vitro, whereas high G density without clustering is sufficient thereafter. *Molecular and cellular biology*. 2009;29(11):3124-33.
18. Gabbai CB, Marians KJ. Recruitment to stalled replication forks of the PriA DNA helicase and replisome-loading activities is essential for survival. *DNA repair*. 2010;9(3):202-9.
19. de Massy B, Fayet O, Kogoma T. Multiple origin usage for DNA replication in sdrA(rnh) mutants of *Escherichia coli* K-12. Initiation in the absence of oriC. *Journal of molecular biology*. 1984;178(2):227-36.

20. Nishitani H, Hidaka M, Horiuchi T. Specific chromosomal sites enhancing homologous recombination in *Escherichia coli* mutants defective in RNase H. *Molecular & general genetics : MGG*. 1993;240(3):307-14.
21. Maduiki NZ, Tehranchi AK, Wang JD, Kreuzer KN. Replication of the *Escherichia coli* chromosome in RNase HI-deficient cells: multiple initiation regions and fork dynamics. *Mol Microbiol*. 2014;91(1):39-56.
22. Leela JK, Syeda AH, Anupama K, Gowrishankar J. Rho-dependent transcription termination is essential to prevent excessive genome-wide R-loops in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2013;110(1):258-63.
23. Gowrishankar J. End of the beginning: elongation and termination features of alternative modes of chromosomal replication initiation in bacteria. *PLoS genetics*. 2015;11(1):e1004909.
24. Wimberly H, Shee C, Thornton PC, Sivaramakrishnan P, Rosenberg SM, Hastings PJ. R-loops and nicks initiate DNA breakage and genome instability in non-growing *Escherichia coli*. *Nature communications*. 2013;4:2115.
25. Stuckey R, Garcia-Rodriguez N, Aguilera A, Wellinger RE. Role for RNA:DNA hybrids in origin-independent replication priming in a eukaryotic system. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2015;112(18):5779-84.
26. Skourti-Stathaki K, Proudfoot NJ. A double-edged sword: R loops as threats to genome integrity and powerful regulators of gene expression. *Genes & development*. 2014;28(13):1384-96.
27. Groh M, Gromak N. Out of balance: R-loops in human disease. *PLoS genetics*. 2014;10(9):e1004630.
28. Champoux JJ. DNA topoisomerases: structure, function, and mechanism. *Annual review of biochemistry*. 2001;70:369-413.
29. Chen SH, Chan NL, Hsieh TS. New mechanistic and functional insights into DNA topoisomerases. *Annu Rev Biochem*. 2013;82:139-70.
30. Stockum A, Lloyd RG, Rudolph CJ. On the viability of *Escherichia coli* cells lacking DNA topoisomerase I. *BMC microbiology*. 2012;12:26.
31. Pruss GJ, Manes SH, Drlica K. *Escherichia coli* DNA topoisomerase I mutants: increased supercoiling is corrected by mutations near gyrase genes. *Cell*. 1982;31(1):35-42.
32. DiNardo S, Voelkel KA, Sternglanz R, Reynolds AE, Wright A. *Escherichia coli* DNA topoisomerase I mutants have compensatory mutations in DNA gyrase genes. *Cell*. 1982;31(1):43-51.
33. Drolet M, Phoenix P, Menzel R, Masse E, Liu LF, Crouch RJ. Overexpression of RNase H partially complements the growth defect of an *Escherichia coli* delta topA mutant: R-loop formation is a major problem in the absence of DNA topoisomerase I. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995;92(8):3526-30.
34. Nurse P, Levine C, Hassing H, Marians KJ. Topoisomerase III can serve as the cellular decatenase in *Escherichia coli*. *J Biol Chem*. 2003;278(10):8653-60.
35. Perez-Cheeks BA, Lee C, Hayama R, Marians KJ. A role for topoisomerase III in *Escherichia coli* chromosome segregation. *Mol Microbiol*. 2012;86(4):1007-22.
36. DiGate RJ, Marians KJ. Molecular cloning and DNA sequence analysis of *Escherichia coli* topB, the gene encoding topoisomerase III. *The Journal of biological chemistry*. 1989;264(30):17924-30.

37. Lopez CR, Yang S, Deibler RW, Ray SA, Pennington JM, Digate RJ, et al. A role for topoisomerase III in a recombination pathway alternative to RuvABC. *Molecular microbiology*. 2005;58(1):80-101.
38. Phoenix P, Raymond MA, Masse E, Drolet M. Roles of DNA topoisomerases in the regulation of R-loop formation in vitro. *J Biol Chem*. 1997;272(3):1473-9.
39. Broccoli S, Phoenix P, Drolet M. Isolation of the topB gene encoding DNA topoisomerase III as a multicopy suppressor of topA null mutations in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol*. 2000;35(1):58-68.
40. Zhu Q, Pongpech P, DiGate RJ. Type I topoisomerase activity is required for proper chromosomal segregation in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98(17):9766-71.
41. Hiasa H, Marians KJ. Tus prevents overreplication of oriC plasmid DNA. *The Journal of biological chemistry*. 1994;269(43):26959-68.
42. Wendel BM, Courcelle CT, Courcelle J. Completion of DNA replication in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014;111(46):16454-9.
43. Usongo V, Tanguay C, Nolent F, Bessong JE, Drolet M. Interplay between type 1A topoisomerases and gyrase in chromosome segregation in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*. 2013;195(8):1758-68.
44. Baba T, Ara T, Hasegawa M, Takai Y, Okumura Y, Baba M, et al. Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection. *Molecular systems biology*. 2006;2:2006 0008.
45. Usongo V, Nolent F, Sanscartier P, Tanguay C, Broccoli S, Baaklini I, et al. Depletion of RNase HI activity in *Escherichia coli* lacking DNA topoisomerase I leads to defects in DNA supercoiling and segregation. *Mol Microbiol*. 2008;69(4):968-81.
46. Masse E, Phoenix P, Drolet M. DNA topoisomerases regulate R-loop formation during transcription of the *rrnB* operon in *Escherichia coli*. *J Biol Chem*. 1997;272(19):12816-23.
47. Ferullo DJ, Cooper DL, Moore HR, Lovett ST. Cell cycle synchronization of *Escherichia coli* using the stringent response, with fluorescence labeling assays for DNA content and replication. *Methods*. 2009;48(1):8-13.
48. Masai H, Asai T, Kubota Y, Arai K, Kogoma T. *Escherichia coli* PriA protein is essential for inducible and constitutive stable DNA replication. *EMBO J*. 1994;13(22):5338-45.
49. Hong X, Cadwell GW, Kogoma T. *Escherichia coli* RecG and RecA proteins in R-loop formation. *The EMBO journal*. 1995;14(10):2385-92.
50. Rudolph CJ, Upton AL, Stockum A, Nieduszynski CA, Lloyd RG. Avoiding chromosome pathology when replication forks collide. *Nature*. 2013;500(7464):608-11.
51. Hong X, Cadwell GW, Kogoma T. Activation of stable DNA replication in rapidly growing *Escherichia coli* at the time of entry to stationary phase. *Molecular microbiology*. 1996;21(5):953-61.
52. von Meyenburg K, Boye E, Skarstad K, Koppes L, Kogoma T. Mode of initiation of constitutive stable DNA replication in RNase H-defective mutants of *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol*. 1987;169(6):2650-8.
53. Kato J, Nishimura Y, Suzuki H. *Escherichia coli* *parA* is an allele of the *gyrB* gene. *Molecular & general genetics : MGG*. 1989;217(1):178-81.
54. Itaya M, Crouch RJ. A combination of RNase H (*rnh*) and *recBCD* or *sbcB* mutations in *Escherichia coli* K12 adversely affects growth. *Mol Gen Genet*. 1991;227(3):424-32.

55. Kogoma T, Hong X, Cadwell GW, Barnard KG, Asai T. Requirement of homologous recombination functions for viability of the *Escherichia coli* cell that lacks RNase HI and exonuclease V activities. *Biochimie*. 1993;75(1-2):89-99.
56. Minden JS, Marians KJ. *Escherichia coli* topoisomerase I can segregate replicating pBR322 daughter DNA molecules in vitro. *J Biol Chem*. 1986;261(25):11906-17.
57. Wang JC. DNA topoisomerases: why so many? *J Biol Chem*. 1991;266(11):6659-62.
58. Adams DE, Shekhtman EM, Zechiedrich EL, Schmid MB, Cozzarelli NR. The role of topoisomerase IV in partitioning bacterial replicons and the structure of catenated intermediates in DNA replication. *Cell*. 1992;71(2):277-88.
59. Peng H, Marians KJ. Decatenation activity of topoisomerase IV during *oriC* and pBR322 DNA replication in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1993;90(18):8571-5.
60. Markovitz A. A new in vivo termination function for DNA polymerase I of *Escherichia coli* K12. *Mol Microbiol*. 2005;55(6):1867-82.
61. Holmes VF, Cozzarelli NR. Closing the ring: links between SMC proteins and chromosome partitioning, condensation, and supercoiling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2000;97(4):1322-4.

## Chapitre 3 : Discussion

### Développement d'une nouvelle technique de détection du cSDR

Dans ce travail, nous avons développé une technique de détection de synthèse d'ADN cSDR. Cette technique est basée sur l'incorporation de l'analogue à la thymidine, soit la 5-éthynyl-2'-deoxyuridine (EdU), suivi par sa détection par un azide fluorescent, l'Alexa Fluor-488. Comparativement aux protocoles employant la  $H^3$ -thymidine, l'EdU n'est pas radioactif et la détection ne passe pas par une étape d'autoradiographie, qui en plus d'être de faible résolution, demande beaucoup de manipulations(157). Cette nouvelle procédure est beaucoup plus sensible et rapide. De plus, la réaction entre l'EdU incorporé dans l'ADN et l'Alexa Fluor ne requiert pas d'étape de dénaturation(157). Ainsi, la détection n'est pas limitée à une population et peut se mesurer à un niveau cellulaire. La détection du taux de fluorochrome contenu au sein des différentes cellules se fait à l'aide de la cytométrie en flux.

L'incorporation de l'EdU pendant la synthèse d'ADN n'est pas limitée à la réplication cSDR. Ainsi, nous avons employé le spectinomycine afin d'inhiber la réplication normale de l'ADN *DnaA/oriC* en bloquant la synthèse *de novo* de DnaA. En effet, contrairement à la réplication normale, le SDR est reconnu comme étant indépendant de la synthèse protéique(147). La réplication cSDR se retrouve dans le mutant *rnhA*, et permet la réplication complète du chromosome lorsque le gène *dnaA* est inhibé, mais reste tout de même deux fois moins efficace que la réplication *oriC/DnaA*(147). L'application de notre technique chez le mutant *rnhA* fournit des résultats qui sont en accord avec la littérature, ce qui confirme la fidélité de ce protocole. De plus, des évidences génétiques récentes suggèrent que la protéine DnaT est essentielle dans la réplication cSDR(86). DnaT est une protéine impliquée dans le chargement du primosome. En effet, comme la surexpression de la RNase HI, la délétion de *dnaT* complémente les défauts du double mutant *topA topB*(86). Encore une fois, notre technique est en accord avec la littérature et détecte moins de cSDR dans le mutant *rnhA* lorsque le gène *dnaT* est inhibé.



## Fonction des topoisomérases 1A dans le cSDR

Au cours de cette étude, les résultats obtenus à l'aide de la cytométrie en flux ont permis de mettre en évidence la présence de réplication cSDR chez différentes souches déficientes en topoisomérases de type 1A. Antérieurement, notre laboratoire avait démontré que les défauts de ségrégation et de croissance du double mutant *topA topB* étaient corrigés par la surexpression de la RNase HI(86). Ces évidences génétiques suggéraient ainsi que les problèmes de cette souche provenaient de la réplication à partir de R-loops. Les résultats de ce travail confirment la présence de cSDR dans une souche déficiente en topoisomérase 1A en détectant de la synthèse d'ADN en présence de spectinomycine, laquelle inhibe la synthèse à partir d'*oriC*, et par sa sensibilité à la surexpression de la RNase HI. Nos résultats révèlent d'ailleurs la présence de cSDR chez le mutant *topA*, indiquant que la Topo I semble être la plus importante topoisomérase dans l'inhibition du cSDR. Des résultats *in vivo* et *in vitro* démontrent l'importance de la relaxation du surenroulement négatif par la Topo I pendant la transcription afin de prévenir la formation de R-loops(141). En ce qui concerne la Topo III, des résultats *in vitro* exposent sa capacité de reconnaître et d'agir sur les R-loops(55). Cependant, aucune réplication cSDR n'a été détectée dans le mutant *topB*. De plus, nous avons observé que la délétion de *topB* n'amplifie pas les phénotypes liés au cSDR du mutant *rnhA*. Sachant que la délétion de *topB* dans une souche *topA* occasionne des défauts de ségrégation et de croissance, mais pas chez le mutant *rnhA*, ceci suggère que la Topo I et la Topo III partagent une fonction essentielle pendant la ségrégation chez les cellules qui font du cSDR.

La suppression du gène *topB* dans un mutant *topA* engendre plusieurs problèmes chez *E. coli* dont un défaut de croissance, de la filamentation et une structure aberrante du nucléoïde(164). Ceci indique que les Topos de type 1A possèdent un rôle dans la ségrégation du chromosome et la division cellulaire. La surexpression de la RNase HI corrige significativement les défauts de ségrégation et de croissance(86). Les problèmes reliés aux R-loops du mutant *topA* s'aggravent lorsqu'il y a délétion du gène *topB*, et ils se manifestent principalement par un défaut de ségrégation(86). La délétion de *recA* dans le mutant *topA topB* supprime complètement les défauts de ségrégation, et partiellement la filamentation(164). Parallèlement, la délétion du gène *recQ* n'a aucun effet. Ceci pourrait supposer que les

problèmes de ségrégation proviennent d'une déficience dans la résolution d'intermédiaires de recombinaison indépendants de RecQ en absence de Topos de type 1A. Cependant, il a été démontré que la surproduction de la RNase HI n'a aucun effet sur ce triple mutant lorsque le gène *recA* est inhibé(86). Ainsi, ceci indique que les défauts de ségrégation induits suite à la formation de R-loops requièrent la présence de RecA. La protéine RecA est également requise pour initier le cSDR à partir de R-loops, ce qui peut également indiquer un problème de ségrégation dû à cette sur-réplication. De plus, la délétion de *recA* corrige le phénotype de *topA*, peu importe la présence ou l'absence de *topB*(164), ce qui indique que la Topo I est la Topo de type 1A principalement impliquée.

La contribution de la protéine DnaT dans l'initiation de la réplication à partir de R-loops a été démontrée par l'inhibition de la réplication du mutant *rnhA dnaA*(Ts) à 42°C lorsque le gène *dnaT* est inhibé(86). L'implication de la RNase E (*rne*) dans le cSDR a été démontrée par le même procédé(86). La délétion des gènes *dnaT* et *rne* corrige partiellement les défauts de ségrégation et de croissance du mutant *topA topB gyrB*(Ts) à 30°C. Ceci suggère fortement que les défauts de ségrégation dépendant des R-loops et de RecA sont liés à la sur-réplication initiée à partir des R-loops. En absence de Topo 1A, la cellule souffre d'un excès de réplication. De plus, la délétion de *dnaT* aide le mutant *topA* (30°C et 24°C)(86). Le cSDR est un problème en absence de Topo I et ce défaut est amplifié en absence de la Topo III. Ceci suggère que la Topo I est la principale topoisomérase de type 1A impliquée dans l'inhibition de la formation des R-loops. En parallèle, il a été démontré que la délétion de *holC*, un gène codant pour la sous-unité Chi de la polymérase III impliquée dans l'initiation et l'élongation de la réplication, est également favorable dans la correction du problème de croissance de la souche *topA topB gyrB*(Ts)(86). De plus, cette mutation *holC* réduit le cSDR dans un mutant *rnhA*(165). Ceci indique que la sous-unité Chi, impliquée dans la stabilité du réplisome, est également importante pour le cSDR.

Pendant longtemps, il a été émis que les défauts de ségrégation et de croissance du double mutant *topA topB* ne sont pas corrigés par la surexpression de la Topo IV à 30°C(164). Ceci supposait que les défauts de cette souche ne provenaient pas de la décaténation. Cependant, des résultats récents de notre laboratoire ont mis en évidence la présence d'une duplication des gènes *parE/parC* dans le double mutant *topA topB*. Ainsi, la surexpression de la Topo IV par le plasmide ne devait pas avoir d'effet puisqu'il devait déjà y avoir saturation

de l'enzyme. La pression sélective menant à la duplication de ces gènes démontre l'important besoin de la Topo IV en absence des Topos 1A, et que les défauts de ségrégation peuvent provenir d'un défaut dans la décaténation en absence des Topos de type 1A.

### **La sur-réplication du chromosome par le cSDR peut être responsable des problèmes de ségrégation chez le double mutant *topA topB***

La nature du chromosome circulaire et de la réplication bidirectionnelle de l'ADN chez *E. coli* implique une rencontre éventuelle entre les fourches de réplication. Heureusement, l'unique origine de réplication *oriC* limite cet évènement à une seule fois. Cette rencontre est localisée dans la région terminale, bordée par des séquences *ter* liées à la protéine Tus, qui restreint la progression des fourches au-delà. Cette fonction de *ter*/Tus est très importante pour prévenir la sur-réplication. En effet, il a été démontré que les collisions de fourches de réplication engendrent un évènement d'initiation de la réplication(166). Lorsque les fourches se rencontrent, l'hélicase DnaB génère une extrémité 3' libre en déplaçant le brin continu fille du replisome opposé. Cette extrémité 3' libre est soit dégradée par une 3' exonucléase simple brin, soit convertie en extrémité 5' par RecG puis dégradée par une 5' exonucléase simple brin. En absence de l'activité de RecG ou de la 3' exonucléase, l'extrémité 3' libre se maintient puis est reconnue par PriA qui assemble le primosome. Une fois installée, la nouvelle fourche réplique l'ADN et génère une extrémité libre double brin derrière. Cette extrémité est reconnue par RecA et forme une structure en D-loop via la recombinaison homologue RecBCD-RecA dépendant. Ce D-loop est également reconnu par PriA qui assemble le primosome dans la direction opposée(166). Une étude effectuée sur des cellules comportant deux séquences *oriC* démontre que la collision entre les fourches de réplication peut engendrer l'initiation de la réplication, peu importe leur localisation sur le chromosome(167). Lorsque ces fourches se rencontrent dans la région terminale, elles initient un nouvel évènement de réplication et redirigent cette réplication vers *oriC*. Sans *ter*/Tus, ou la polarité de la transcription, ces fourches de réplifications se rencontreraient de nouveau à *oriC*, initieraient encore une fois la réplication, menant à une boucle sans fin qui génère une grande instabilité génomique.

Les cellules qui font du cSDR peuvent initier la réplication à *oriC* par le mécanisme DnaA/*oriC*, mais également à d'autres sites, tels qu'*oriK* pour le mutant *rnhA*(147). En effet,

la quantité de fourches bloquées aux séquences *terB* et *terC* chez le mutant *rnhA* est respectivement 11 fois et 7 fois supérieure à la souche sauvage(155). Ceci s'explique par la réplication originant aux sites *oriK* qui s'additionne à la réplication normale *oriC*/DnaA et qui se termine également à la région terminale du chromosome. De plus, des analyses de séquençage à haut débit révèlent un excès de réplication de l'ADN dans la région TerA-TerC des mutants *rnhA*. Ce type d'analyse montre le patron de réplication d'une souche en exposant l'origine et la région terminale qui respectivement représentent la région se retrouvant avec le moins grand nombre de copies, et la région avec le plus de copies. Une souche sauvage est représentée par un pic élevé à *oriC* et un pic bas au terminus. Contrairement à ce patron, le mutant *rnhA* possède un pic faiblement défini à *oriC* et une quantité régulière de copie d'ADN le long du chromosome(155). De plus, un second pic se retrouve entre les séquences *terA* et *terC*(155). Ces résultats démontrent la présence d'une sur-réplication sur tout le chromosome, et cela particulièrement dans la région terminale où se retrouve au moins un *oriK* actif. La réplication cSDR peut, à elle seule, occasionner les phénotypes dus à la sur-réplication du chromosome. Cependant, la présence de plusieurs sites d'origine de réplication implique que les fourches de réplication peuvent se rencontrer en dehors de la région terminale du chromosome. Par conséquent, la réplication initiée par la collision des fourches de réplication n'est pas limitée par le complexe *ter*/Tus, mais peut se poursuivre indéfiniment suite à la rencontre d'autres fourches de réplication.

L'augmentation du nombre de fourches de réplication sur le chromosome par le cSDR indique la présence d'une amplification incontrôlée du chromosome. Cette réplication pathologique peut occasionner des défauts de ségrégation et de la filamentation(168). De plus, ce phénomène peut affecter la stabilité du génome en causant la duplication de certains gènes(168). La localisation de sites *oriK* en dehors de la région terminale aggrave la situation puisque cette réplication n'est pas limitée entre les séquences *ter*, qui autrement empêcherait la propagation de fourches de réplication aberrantes. Cependant, dans le cas du mutant *rnhA*, les défauts de ségrégation et de filamentation ne sont pas aussi importants. Ceci peut s'expliquer par la présence d'enzymes tels que RecG(169) ou des topoisomérases (plus bas) qui peuvent agir avant ou pendant la ségrégation, aidant ainsi la séparation des chromosomes dans ces conditions. Malgré la présence de ces enzymes, il existe bel et bien un problème dans la terminaison de la réplication du mutant *rnhA* puisqu'on retrouve des variations du nombre de

copies des séquences dans le terminus. Dans le cas du mutant *rnhA*, plusieurs «hotspots» pour la recombinaison homologue (sites hot) ont été retrouvés, et cela majoritairement dans la région terminale du chromosome(170). De plus, la délétion de *recB* dans le mutant *rnhA* a un effet létal, contrairement à la délétion de *recA*(171).

RecBCD est un complexe enzymatique hélicase-nucléase principalement reconnu pour son rôle dans la réparation des cassures d'ADN double brin employant la recombinaison homologue(172). Ce complexe reconnaît les extrémités d'ADN double brin et initie la recombinaison entre les deux molécules lorsqu'il rencontre un site Chi. La perte de *recD* inactive l'activité nucléase du complexe enzymatique, supprime sa capacité à reconnaître les séquences Chi mais conserve son activité hélicase. Toutefois, la perte de *recBC* inactive l'enzyme(172). Il a été précédemment démontré que les séquences *ter* sont des «hotspots» pour la recombinaison médiée par RecBCD(173), ce qui implique la formation d'un substrat reconnu par ce complexe dans la région de terminaison de la réplication. L'étude des mutants *recBC* et *recD* a également montré que ces sous-unités sont requises pour la reconnaissance et la résolution des extrémités formées vers les dernières étapes de la réplication, lors de la rencontre des fourches au site de dédoublement. En effet, ces mutants ont de la difficulté à maintenir des plasmides monomériques(174). De plus, des études de séquençage à haut débit ont montré que le mutant *recBC* possède une séquence terminus sous-répliquée par rapport à la souche sauvage, alors que chez le mutant *recD* elle est sur-représentée(174). Ceci laisse sous-entendre que la sur-réplication chez le mutant *recD* provient de la convergence des fourches de réplication qui se passe l'un et l'autre transitoirement. L'activité nucléase de RecBCD enlèverait normalement ces intermédiaires sur-répliqués jusqu'au point de rencontre des fourches(174). Le procédé par lequel RecBCD complète la réplication de l'ADN n'implique pas d'intermédiaires de cassure double brin, de recombinaison homologue, ni RecA puisque la réplication du chromosome se termine normalement chez les mutants *recA* et *recF*(174). Les cellules qui répliquent à partir des R-loops vont subir beaucoup plus de collision de fourches répliquatives et de sur-réplication, d'où l'importance de l'activité de *recBCD* pendant la terminaison de la réplication.

Les résultats de la présente recherche montrent que la Topo I réprime la réplication cSDR, potentiellement en inhibant la formation des R-loops. Cette étude montre également que la délétion de *topB*, en plus de *topA* génère des défauts dans la ségrégation et que ceux-ci

sont reliés aux R-loops et à la réplication cSDR. Cependant, la délétion de *topB* seule n'engendre pas de cSDR et son inhibition dans le mutant *rnhA* ne génère pas des problèmes de ségrégation comme dans le cas du mutant *topA*. De plus, des évidences génétiques montrent que la surexpression de la Topo III corrige les défauts de ségrégation du mutant *topA rnhA*(90). L'ensemble de ces résultats suggère que les topoisomérases de type IA possèdent une fonction commune et essentielle pendant la ségrégation chez les cellules qui font du cSDR.

La délétion du gène *topA* engendre des défauts de croissance et de ségrégation, et ce phénotype est exacerbé dans le double mutant *topA rnhA*. Ces défauts causés par le simple et le double mutant ne sont toutefois pas observés dans le mutant *topB*, et peuvent être corrigés par la surexpression de la Topo III. Ces informations suggèrent que la Topo I est la Topo 1A primaire dans le contrôle du cSDR. Des résultats *in vitro* antérieurs montrent cependant que les R-loops sont des «hotspots» pour la Topo III, et que cette dernière peut les enlever(55). La difficulté d'observer cette activité *in vivo* peut provenir du fait que la Topo III se retrouve en faible quantité dans la cellule, ce qui expliquerait l'absence de phénotype lors de la délétion de *topB* dans un mutant *rnhA*. Puisque la surexpression de la Topo III aide le mutant *topA*, ainsi que le double mutant *topA rnhA*, il serait intéressant de tester si ce rétablissement est dû à l'action directe des plus grandes concentrations de Topo III sur les R-loops, réduisant ainsi les instances de cSDR. La surexpression de la Topo III dans le mutant *rnhA* pourrait également être effectuée afin d'observer si, en plus grande concentration, elle peut agir sur les R-loops et ainsi réduire la réplication cSDR.

Contrairement à la délétion de *topB* dans le mutant *rnhA*, l'absence de Topo III dans le mutant *topA* amplifie ses phénotypes dus au cSDR. De plus, la délétion de la RNase HI seule n'occasionne pas de longs filaments, ni de graves problèmes de ségrégation ou de croissance. Ceci indique que la présence d'une Topo 1A est essentielle dans les cellules qui font du cSDR et que cette fonction est reliée à la ségrégation.

La topoisomérase I est principalement reconnue pour son rôle dans la relaxation de l'ADN. Cependant, des évidences génétiques ont montré son implication potentielle dans la terminaison de la réplication. En effet, la délétion de *recB* dans un mutant *topA* inhibe complètement la croissance. De plus, la délétion de *recA* complémente partiellement le mutant *topA*(86). Ceci suggère que le mutant *topA* requiert une fonction de RecBCD qui est

indépendante de RecA, telle que dans la terminaison de la réplication(174), comme décrit plus haut. De plus, les ratios *ori/ter* sont inférieurs dans le mutant *topA*(86). Des études *in vitro* ont également montré la capacité de la topoisomérase I d'effectuer la ségrégation des chromosomes, à l'aide d'un système répliatif de pBR322 entièrement composé de protéines purifiées(105). Ce système initie la réplication, synthétise largement de l'ADN, mais n'a pas la capacité de terminer le cycle répliatif. Lorsque le niveau de Topo I est bas, il y a production de multimères de pBR322, d'intermédiaires tardifs de réplication (LRI) et de molécules d'ADN caténées avec une série de topoisomères surenroulées(105), qui ensemble démontrent la présence d'une barrière aux étapes finales de la réplication. L'augmentation de la quantité de Topo I dans ce système réduit le nombre de ces produits de réaction, et hausse la quantité de molécules d'ADN décaténées. De plus, le nombre de liens intermoléculaires entre les dimères caténées diminue proportionnellement avec l'augmentation de la Topo I. Ces évidences révèlent l'implication de cette enzyme dans un processus de décaténation(105). Par une analyse «Pulse-chase» des intermédiaires de réplication, il a été trouvé que la Topo I délie les molécules d'ADN caténées en agissant sur le duplex parental avant l'achèvement de la réplication(105) puisque en grande concentration de la Topo I, la quantité de molécules d'ADN décaténées augmente avec le temps, alors que les dimères caténées sont maintenus à des niveaux faiblement détectables(105). De manière similaire, lorsque la Topo I est en faible concentration, la quantité de molécules d'ADN caténées ne cesse d'augmenter avec le temps(105). Le tout indique que le mécanisme par lequel les LRI sont résolus pour former des molécules décaténées ne passe pas par des dimères caténées, contrairement à la Topo IV.

En ce qui concerne la seconde Topo 1A, la Topo III est particulièrement reconnue pour son activité de décaténation des précaténanes pendant la réplication de l'ADN. L'implication de la topoisomérase III dans la ségrégation du chromosome a pu être mise en évidence par une technique de dépistage de suppresseurs multi-copies où la surexpression de la topoisomérase III sauvait le mutant létal conditionnel *parE* ou *parC* à température restrictive(175). Sa fonction catalytique est unique à la Topo III puisque la surexpression du gène *topA* ne parvient à rétablir les défauts de ces mutants à température non permissive. De plus, la délétion de *topB* dans ce mutant exacerbe les défauts de croissance et de ségrégation. Il a également été montré que la novobiocine, un antibiotique agissant sur la Topo IV, inhibe la croissance du mutant *topB*, démontrant encore une fois l'implication de la Topo III au niveau de la ségrégation de

l'ADN. Dans ces conditions, la Topo III agit au niveau de la décaténation et non pas au travers d'intermédiaires de recombinaison puisque ni la délétion de *recA*, ou de *recQ* ne nuit au rétablissement des mutant *parE* ou *parE topB* dans des conditions non-permissives. Ceci suggère que la Topo III effectue la décaténation au niveau des précaténanes, probablement derrière la fourche répliquative, près de l'ADN polymérase ou au niveau des fragments d'Okazaki, là où l'on retrouve de l'ADN simple brin(176).

Des études *in vitro* ont réussi à démontrer un tel mécanisme à l'aide de l'hélicase RecQ, la topoisomérase III et la protéine SSB(58). En effet, lors de la répllication par *oriC* d'ADN plasmidique, des intermédiaires de répllication tardive ont pu être observés. Ces intermédiaires représentent deux plasmides nouvellement synthétisés, toutefois joints par 130pb de brins parentaux non répliqués. Grâce à la présence de ces trois protéines, ces produits peuvent se transformer en molécules monomériques avec un espacement simple brin. L'hélicase RecQ sépare les brins du duplex parental, fournissant ainsi de l'ADN simple brin pour l'activité décaténase de la topoisomérase III. L'activité de la topoisomérase I est très faible par rapport à la Topo III pour résoudre ces intermédiaires, ce qui peut expliquer sa préférence de lier des brins d'ADN simple brin à proximité d'ADN double brin, ce qui n'est pas important pour la Topo III. La résolution des fourches convergentes par RecQ et Topo III ne se limite pas à la terminaison de la répllication. Des défauts de convergence des fourches de répllication peuvent mener à des défauts de ségrégation du chromosome, tel que déjà démontré chez le mutant *recQ*(177) et le mutant *topB*(164).

Ensemble, ces évidences montrent la capacité de la Topo I et de la Topo III d'agir au niveau de la décaténation pendant la répllication du chromosome. Tel que mentionné dans l'introduction, deux voies ont été émises pour la décaténation : une voie impliquant les Topos de type II et l'autre les Topos de type 1A. La première voie permet la répllication complète de l'ADN avant de séparer le chromosome. La seconde implique la séparation avant la répllication complète. Le modèle impliquant les Topo 1A pourrait s'avérer essentiel dans les cellules qui font du cSDR, et ceci peut s'expliquer de deux manières. Tout d'abord, comme expliquées plus haut, les collisions entre les fourches de répllication peuvent mener à l'initiation de nouvelles rondes de répllication. Les cellules qui font du cSDR peuvent initier la répllication à partir des séquences *oriC* et *oriK*. Cette augmentation du nombre d'origines augmente le taux de collision dans la cellule. De plus, la position de plusieurs sites *oriK* sur le chromosome



permet des évènements de collision en dehors du terminus. Ainsi, la sur-réplication du chromosome n'est plus limitée par *ter/Tus* et peut engendrer des conséquences désastreuses au niveau de la ségrégation et de l'intégrité du génome. L'activité des topoisomérases 1A dans la décaténation prévient les collisions entre les fourches de réplication en déliant les chromosomes avant la fin de la réplication, prévenant ainsi la réplication perpétuelle du chromosome. Ainsi, un mutant comme *rnhA* qui mène à de hauts taux cSDR, ne possède pas des phénotypes aussi drastiques au niveau de la ségrégation comme le double mutant *topA-topB*, puisqu'elle possède les Topos 1A nécessaires pour la décaténation par la seconde voie. La deuxième manière permet d'expliquer les évènements d'hyper-recombinaison dans les cellules qui sur-répliquent leur ADN. La région terminale du chromosome est reconnue pour sur-répliquer l'ADN et d'être recombinogène. Il a été démontré que le mutant *topA topB* peut être sauvé par la délétion du gène *recA(164)*. Ceci peut suggérer que les Topos 1A sont impliquées dans la recombinaison dépendante de RecA et peuvent résoudre ces intermédiaires de recombinaison spécialement avant la ségrégation du chromosome. La sur-réplication qui n'est pas limitée à la région terminale pendant le cSDR peut engendrer des intermédiaires de recombinaison sur tout le chromosome et ainsi nécessiter l'activité des Topos 1A pour les résoudre et permettre la bonne ségrégation du chromosome.

### **Les topoisomérases 1A sont également impliquées dans la décaténation, indépendamment du cSDR**

Tel que mentionné plus haut, le double mutant *topA topB* possède une duplication dans les gènes codant pour la Topo IV (Drolet et al., résultats non-publiés). Ceci indique que la déplétion en Topo 1A crée des défauts dans la décaténation, et que ces derniers sont complétés par la surexpression de la Topo IV. Ce problème dans la décaténation est indépendant du cSDR puisque cette duplication survient également lorsque la RNase HI est surexprimée. La suppression du gène *topA* cause un défaut de ségrégation chez *E. coli*. Ce défaut de ségrégation est indépendant de la formation des R-loops puisque la surproduction de la RNaseHI ne le corrige pas chez le mutant *topA gyrB(Ts)* à température permissive(86). À basse température, le niveau d'activité de la gyrase crée un haut niveau de surenroulement négatif en absence de la Topo I. La surproduction de la Topo III supprime presque totalement le défaut de ségrégation chez le mutant *topA* dans ces conditions(86). La Topo III peut ainsi

complémenter une fonction de la Topo I lorsqu'elle se retrouve en plus grande concentration. Cette fonction provenant d'une Topo de type 1A est ainsi essentielle dans le succès de la ségrégation du chromosome. De plus, la délétion de *recQ* ou de *recA* corrige partiellement le problème de ségrégation du mutant *topA(86)*, ce qui suggère que RecQ et la Topo III emprunte un mécanisme commun impliquant la résolution d'intermédiaire de recombinaison par la recombinaison homologe. RecQ ne passe pas par une voie RecFOR puisque la délétion de *recJ*, *recO* ou *recR* n'aide pas le mutant *topA(86)*. RecQ doit plutôt agir avec une Topo de type 1A dans un mécanisme dépendant de RecA, ce qui indique l'implication de la voie RecBCD. Ces informations proposent que les Topos IA sont importantes dans la résolution des intermédiaires de recombinaison et que cette fonction est importante pour la bonne ségrégation du chromosome même en absence de cSDR. L'absence de défaut de ségrégation et de croissance chez le mutant *topB* comparativement au mutant *topA* évoque l'importance du rôle de la Topo I dans cette ségrégation. Également, l'incapacité de la Topo III de compenser les défauts du mutant *topA* en concentration normale comparativement à la Topo I dans le mutant *topB* suggère la même conclusion.

## **Conclusion**

En conclusion, cette nouvelle technique de détection du cSDR a permis de mieux comprendre les fonctions des topoisomérases de type 1A dans la réplication cSDR en mesurant leur taux de réplication en présence de spectinomycine. Les topoisomérases de type 1A sont importantes dans la régulation du cSDR, particulièrement la topoisomérase I qui inhibe la formation des R-loops en relaxant l'ADN pendant la transcription. Ensemble, les Topos 1A possèdent une fonction importante dans la ségrégation des chromosomes en résolvant les intermédiaires de recombinaison. Cette fonction est particulièrement essentielle dans les cellules qui répliquent par le cSDR.



## Bibliographie

1. Watson JD, Crick FH. Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature*. 1953;171(4356):737-8.
2. Avery OT, Macleod CM, McCarty M. Studies on the Chemical Nature of the Substance Inducing Transformation of Pneumococcal Types : Induction of Transformation by a Desoxyribonucleic Acid Fraction Isolated from Pneumococcus Type Iii. *J Exp Med*. 1944;79(2):137-58.
3. Franklin RE, Gosling RG. Molecular configuration in sodium thymonucleate. *Nature*. 1953;171(4356):740-1.
4. Hormeno S, Ibarra B, Carrascosa JL, Valpuesta JM, Moreno-Herrero F, Arias-Gonzalez JR. Mechanical properties of high-G.C content DNA with a-type base-stacking. *Biophys J*. 2011;100(8):1996-2005.
5. Bates AD, Maxwell A. DNA topology: topoisomerases keep it simple. *Curr Biol*. 1997;7(12):R778-81.
6. Vologodskii AV, Cozzarelli NR. Conformational and thermodynamic properties of supercoiled DNA. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*. 1994;23:609-43.
7. Zimmerman SB. Shape and compaction of Escherichia coli nucleoids. *J Struct Biol*. 2006;156(2):255-61.
8. Boles TC, White JH, Cozzarelli NR. Structure of plectonemically supercoiled DNA. *J Mol Biol*. 1990;213(4):931-51.
9. Drlica K. Control of bacterial DNA supercoiling. *Mol Microbiol*. 1992;6(4):425-33.
10. Depew DE, Wang JC. Conformational fluctuations of DNA helix. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1975;72(11):4275-9.
11. Pruss GJ, Manes SH, Drlica K. Escherichia coli DNA topoisomerase I mutants: increased supercoiling is corrected by mutations near gyrase genes. *Cell*. 1982;31(1):35-42.
12. DiNardo S, Voelkel KA, Sternglanz R, Reynolds AE, Wright A. Escherichia coli DNA topoisomerase I mutants have compensatory mutations in DNA gyrase genes. *Cell*. 1982;31(1):43-51.
13. Liu LF, Wang JC. Supercoiling of the DNA template during transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1987;84(20):7024-7.
14. Kouzine F, Gupta A, Baranello L, Wojtowicz D, Ben-Aissa K, Liu J, et al. Transcription-dependent dynamic supercoiling is a short-range genomic force. *Nat Struct Mol Biol*. 2013;20(3):396-403.
15. Wu HY, Shyy SH, Wang JC, Liu LF. Transcription generates positively and negatively supercoiled domains in the template. *Cell*. 1988;53(3):433-40.
16. Wang JC. Interaction between DNA and an Escherichia coli protein omega. *J Mol Biol*. 1971;55(3):523-33.
17. Lima CD, Wang JC, Mondragon A. Crystallization of a 67 kDa fragment of Escherichia coli DNA topoisomerase I. *J Mol Biol*. 1993;232(4):1213-6.
18. Liu Q, Wang JC. Similarity in the catalysis of DNA breakage and rejoining by type IA and IIA DNA topoisomerases. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96(3):881-6.

19. Aravind L, Leipe DD, Koonin EV. Toprim--a conserved catalytic domain in type IA and II topoisomerases, DnaG-type primases, OLD family nucleases and RecR proteins. *Nucleic Acids Res.* 1998;26(18):4205-13.
20. Chen SJ, Wang JC. Identification of active site residues in Escherichia coli DNA topoisomerase I. *J Biol Chem.* 1998;273(11):6050-6.
21. Zhu CX, Tse-Dinh YC. The acidic triad conserved in type IA DNA topoisomerases is required for binding of Mg(II) and subsequent conformational change. *J Biol Chem.* 2000;275(8):5318-22.
22. Zhang HL, Malpure S, Li Z, Hiasa H, DiGate RJ. The role of the carboxyl-terminal amino acid residues in Escherichia coli DNA topoisomerase III-mediated catalysis. *J Biol Chem.* 1996;271(15):9039-45.
23. Viard T, Cossard R, Duguet M, de La Tour CB. Thermotoga maritima-Escherichia coli chimeric topoisomerases. Answers about involvement of the carboxyl-terminal domain in DNA topoisomerase I-mediated catalysis. *J Biol Chem.* 2004;279(29):30073-80.
24. Duguet M, Serre MC, Bouthier de La Tour C. A universal type IA topoisomerase fold. *J Mol Biol.* 2006;359(3):805-12.
25. Berger JM. Structure of DNA topoisomerases. *Biochim Biophys Acta.* 1998;1400(1-3):3-18.
26. Mondragon A, DiGate R. The structure of Escherichia coli DNA topoisomerase III. *Structure.* 1999;7(11):1373-83.
27. Zhu CX, Tse-Dinh YC. Binding of Zn(II) to Escherichia coli DNA topoisomerase I. *Biochem Mol Biol Int.* 1994;33(1):195-204.
28. Tse-Dinh YC, Beran-Steed RK. Escherichia coli DNA topoisomerase I is a zinc metalloprotein with three repetitive zinc-binding domains. *J Biol Chem.* 1988;263(31):15857-9.
29. Tse-Dinh YC. Zinc (II) coordination in Escherichia coli DNA topoisomerase I is required for cleavable complex formation with DNA. *J Biol Chem.* 1991;266(22):14317-20.
30. Zhu CX, Samuel M, Pound A, Ahumada A, Tse-Dinh YC. Expression and DNA-binding properties of the 14K carboxyl terminal fragment of Escherichia coli DNA topoisomerase I. *Biochem Mol Biol Int.* 1995;35(2):375-85.
31. Cheng B, Zhu CX, Ji C, Ahumada A, Tse-Dinh YC. Direct interaction between Escherichia coli RNA polymerase and the zinc ribbon domains of DNA topoisomerase I. *J Biol Chem.* 2003;278(33):30705-10.
32. Tiwari PB, Chapagain PP, Banda S, Darici Y, Uren A, Tse-Dinh YC. Characterization of molecular interactions between Escherichia coli RNA polymerase and topoisomerase I by molecular simulations. *FEBS Lett.* 2016;590(17):2844-51.
33. Tse-Dinh YC, Beran RK. Multiple promoters for transcription of the Escherichia coli DNA topoisomerase I gene and their regulation by DNA supercoiling. *J Mol Biol.* 1988;202(4):735-42.
34. Tse-Dinh YC. Regulation of the Escherichia coli DNA topoisomerase I gene by DNA supercoiling. *Nucleic Acids Res.* 1985;13(13):4751-63.
35. Borowiec JA, Zhang L, Sasse-Dwight S, Gralla JD. DNA supercoiling promotes formation of a bent repression loop in lac DNA. *J Mol Biol.* 1987;196(1):101-11.
36. Wang JY, Syvanen M. DNA twist as a transcriptional sensor for environmental changes. *Mol Microbiol.* 1992;6(14):1861-6.

37. Tan K, Zhou Q, Cheng B, Zhang Z, Joachimiak A, Tse-Dinh YC. Structural basis for suppression of hypernegative DNA supercoiling by *E. coli* topoisomerase I. *Nucleic Acids Res.* 2015;43(22):11031-46.
38. Mizushima T, Natori S, Sekimizu K. Relaxation of supercoiled DNA associated with induction of heat shock proteins in *Escherichia coli*. *Mol Gen Genet.* 1993;238(1-2):1-5.
39. Qi H, Menzel R, Tse-Dinh YC. Increased thermosensitivity associated with topoisomerase I deletion and promoter mutations in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett.* 1999;178(1):141-6.
40. Friedman SM, Malik M, Drlica K. DNA supercoiling in a thermotolerant mutant of *Escherichia coli*. *Mol Gen Genet.* 1995;248(4):417-22.
41. Ogata Y, Mizushima T, Kataoka K, Miki T, Sekimizu K. Identification of DNA topoisomerases involved in immediate and transient DNA relaxation induced by heat shock in *Escherichia coli*. *Mol Gen Genet.* 1994;244(5):451-5.
42. Lesley SA, Jovanovich SB, Tse-Dinh YC, Burgess RR. Identification of a heat shock promoter in the *topA* gene of *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 1990;172(12):6871-4.
43. Lindquist S, Craig EA. The heat-shock proteins. *Annu Rev Genet.* 1988;22:631-77.
44. Drolet M, Phoenix P, Menzel R, Masse E, Liu LF, Crouch RJ. Overexpression of RNase H partially complements the growth defect of an *Escherichia coli* delta *topA* mutant: R-loop formation is a major problem in the absence of DNA topoisomerase I. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995;92(8):3526-30.
45. Phoenix P, Raymond MA, Masse E, Drolet M. Roles of DNA topoisomerases in the regulation of R-loop formation in vitro. *J Biol Chem.* 1997;272(3):1473-9.
46. Masse E, Phoenix P, Drolet M. DNA topoisomerases regulate R-loop formation during transcription of the *rrnB* operon in *Escherichia coli*. *J Biol Chem.* 1997;272(19):12816-23.
47. Masse E, Drolet M. Relaxation of transcription-induced negative supercoiling is an essential function of *Escherichia coli* DNA topoisomerase I. *J Biol Chem.* 1999;274(23):16654-8.
48. Masse E, Drolet M. *Escherichia coli* DNA topoisomerase I inhibits R-loop formation by relaxing transcription-induced negative supercoiling. *J Biol Chem.* 1999;274(23):16659-64.
49. Baker NM, Rajan R, Mondragon A. Structural studies of type I topoisomerases. *Nucleic Acids Res.* 2009;37(3):693-701.
50. DiGate RJ, Marians KJ. Molecular cloning and DNA sequence analysis of *Escherichia coli* *topB*, the gene encoding topoisomerase III. *J Biol Chem.* 1989;264(30):17924-30.
51. Zechiedrich EL, Khodursky AB, Bachellier S, Schneider R, Chen D, Lilley DM, et al. Roles of topoisomerases in maintaining steady-state DNA supercoiling in *Escherichia coli*. *J Biol Chem.* 2000;275(11):8103-13.
52. Hiasa H, DiGate RJ, Marians KJ. Decatenating activity of *Escherichia coli* DNA gyrase and topoisomerases I and III during *oriC* and pBR322 DNA replication in vitro. *J Biol Chem.* 1994;269(3):2093-9.
53. DiGate RJ, Marians KJ. Identification of a potent decatenating enzyme from *Escherichia coli*. *J Biol Chem.* 1988;263(26):13366-73.
54. Terekhova K, Gunn KH, Marko JF, Mondragon A. Bacterial topoisomerase I and topoisomerase III relax supercoiled DNA via distinct pathways. *Nucleic Acids Res.* 2012;40(20):10432-40.

55. Broccoli S, Phoenix P, Drolet M. Isolation of the topB gene encoding DNA topoisomerase III as a multicopy suppressor of topA null mutations in Escherichia coli. *Mol Microbiol.* 2000;35(1):58-68.
56. Lopez CR, Yang S, Deibler RW, Ray SA, Pennington JM, Digate RJ, et al. A role for topoisomerase III in a recombination pathway alternative to RuvABC. *Mol Microbiol.* 2005;58(1):80-101.
57. Schofield MA, Agbunag R, Michaels ML, Miller JH. Cloning and sequencing of Escherichia coli mutR shows its identity to topB, encoding topoisomerase III. *J Bacteriol.* 1992;174(15):5168-70.
58. Suski C, Marians KJ. Resolution of converging replication forks by RecQ and topoisomerase III. *Mol Cell.* 2008;30(6):779-89.
59. Ozaki S, Katayama T. DnaA structure, function, and dynamics in the initiation at the chromosomal origin. *Plasmid.* 2009;62(2):71-82.
60. Cassler MR, Grimwade JE, Leonard AC. Cell cycle-specific changes in nucleoprotein complexes at a chromosomal replication origin. *EMBO J.* 1995;14(23):5833-41.
61. McGarry KC, Ryan VT, Grimwade JE, Leonard AC. Two discriminatory binding sites in the Escherichia coli replication origin are required for DNA strand opening by initiator DnaA-ATP. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101(9):2811-6.
62. Bramhill D, Kornberg A. Duplex opening by dnaA protein at novel sequences in initiation of replication at the origin of the E. coli chromosome. *Cell.* 1988;52(5):743-55.
63. LeBowitz JH, McMacken R. The Escherichia coli dnaB replication protein is a DNA helicase. *J Biol Chem.* 1986;261(10):4738-48.
64. Gupta MK, Atkinson J, McGlynn P. DNA structure specificity conferred on a replicative helicase by its loader. *J Biol Chem.* 2010;285(2):979-87.
65. Marszalek J, Kaguni JM. DnaA protein directs the binding of DnaB protein in initiation of DNA replication in Escherichia coli. *J Biol Chem.* 1994;269(7):4883-90.
66. Konieczny I, Helinski DR. Helicase delivery and activation by DnaA and TrfA proteins during the initiation of replication of the broad host range plasmid RK2. *J Biol Chem.* 1997;272(52):33312-8.
67. Lanka E, Schuster H. The dnaC protein of Escherichia coli. Purification, physical properties and interaction with dnaB protein. *Nucleic Acids Res.* 1983;11(4):987-97.
68. Ludlam AV, McNatt MW, Carr KM, Kaguni JM. Essential amino acids of Escherichia coli DnaC protein in an N-terminal domain interact with DnaB helicase. *J Biol Chem.* 2001;276(29):27345-53.
69. Fang L, Davey MJ, O'Donnell M. Replisome assembly at oriC, the replication origin of E. coli, reveals an explanation for initiation sites outside an origin. *Mol Cell.* 1999;4(4):541-53.
70. Makowska-Grzyska M, Kaguni JM. Primase directs the release of DnaC from DnaB. *Mol Cell.* 2010;37(1):90-101.
71. Kaguni JM. Replication initiation at the Escherichia coli chromosomal origin. *Curr Opin Chem Biol.* 2011;15(5):606-13.
72. Arai K, Low R, Kobori J, Shlomai J, Kornberg A. Mechanism of dnaB protein action. V. Association of dnaB protein, protein n', and other repriming proteins in the primosome of DNA replication. *J Biol Chem.* 1981;256(10):5273-80.
73. Jeruzalmi D, O'Donnell M, Kuriyan J. Crystal structure of the processivity clamp loader gamma (gamma) complex of E. coli DNA polymerase III. *Cell.* 2001;106(4):429-41.



74. Naktinis V, Turner J, O'Donnell M. A molecular switch in a replication machine defined by an internal competition for protein rings. *Cell*. 1996;84(1):137-45.
75. Yuzhakov A, Turner J, O'Donnell M. Replisome assembly reveals the basis for asymmetric function in leading and lagging strand replication. *Cell*. 1996;86(6):877-86.
76. Kim S, Dallmann HG, McHenry CS, Marians KJ. Coupling of a replicative polymerase and helicase: a tau-DnaB interaction mediates rapid replication fork movement. *Cell*. 1996;84(4):643-50.
77. Song C, Zhang S, Huang H. Choosing a suitable method for the identification of replication origins in microbial genomes. *Front Microbiol*. 2015;6:1049.
78. Waldminghaus T, Skarstad K. The *Escherichia coli* SeqA protein. *Plasmid*. 2009;61(3):141-50.
79. Fujikawa N, Kurumizaka H, Nureki O, Tanaka Y, Yamazoe M, Hiraga S, et al. Structural and biochemical analyses of hemimethylated DNA binding by the SeqA protein. *Nucleic Acids Res*. 2004;32(1):82-92.
80. Nievera C, Torgue JJ, Grimwade JE, Leonard AC. SeqA blocking of DnaA-oriC interactions ensures staged assembly of the *E. coli* pre-RC. *Mol Cell*. 2006;24(4):581-92.
81. Riber L, Lobner-Olesen A. Coordinated replication and sequestration of oriC and dnaA are required for maintaining controlled once-per-cell-cycle initiation in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*. 2005;187(16):5605-13.
82. Morigen, Molina F, Skarstad K. Deletion of the datA site does not affect once-per-cell-cycle timing but induces rifampin-resistant replication. *J Bacteriol*. 2005;187(12):3913-20.
83. Fujimitsu K, Senriuchi T, Katayama T. Specific genomic sequences of *E. coli* promote replicational initiation by directly reactivating ADP-DnaA. *Genes Dev*. 2009;23(10):1221-33.
84. Riber L, Fujimitsu K, Katayama T, Lobner-Olesen A. Loss of Hda activity stimulates replication initiation from I-box, but not R4 mutant origins in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol*. 2009;71(1):107-22.
85. Ozaki S, Katayama T. Highly organized DnaA-oriC complexes recruit the single-stranded DNA for replication initiation. *Nucleic Acids Res*. 2012;40(4):1648-65.
86. Usongo V, Drolet M. Roles of type 1A topoisomerases in genome maintenance in *Escherichia coli*. *PLoS Genet*. 2014;10(8):e1004543.
87. Funnell BE, Baker TA, Kornberg A. Complete enzymatic replication of plasmids containing the origin of the *Escherichia coli* chromosome. *J Biol Chem*. 1986;261(12):5616-24.
88. Spell RM, Holm C. Nature and distribution of chromosomal intertwinings in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*. 1994;14(2):1465-76.
89. Filutowicz M. Requirement of DNA gyrase for the initiation of chromosome replication in *Escherichia coli* K-12. *Mol Gen Genet*. 1980;177(2):301-9.
90. Usongo V, Tanguay C, Nolent F, Bessong JE, Drolet M. Interplay between type 1A topoisomerases and gyrase in chromosome segregation in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*. 2013;195(8):1758-68.
91. Johnson A, O'Donnell M. Cellular DNA replicases: components and dynamics at the replication fork. *Annu Rev Biochem*. 2005;74:283-315.
92. Reyes-Lamothe R, Sherratt DJ, Leake MC. Stoichiometry and architecture of active DNA replication machinery in *Escherichia coli*. *Science*. 2010;328(5977):498-501.
93. McInerney P, Johnson A, Katz F, O'Donnell M. Characterization of a triple DNA polymerase replisome. *Mol Cell*. 2007;27(4):527-38.

94. Reyes-Lamothe R, Possoz C, Danilova O, Sherratt DJ. Independent positioning and action of *Escherichia coli* replisomes in live cells. *Cell*. 2008;133(1):90-102.
95. Wang JC. Cellular roles of DNA topoisomerases: a molecular perspective. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2002;3(6):430-40.
96. Champoux JJ. DNA topoisomerases: structure, function, and mechanism. *Annu Rev Biochem*. 2001;70:369-413.
97. Postow L, Crisona NJ, Peter BJ, Hardy CD, Cozzarelli NR. Topological challenges to DNA replication: conformations at the fork. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98(15):8219-26.
98. Kirkegaard K, Wang JC. Bacterial DNA topoisomerase I can relax positively supercoiled DNA containing a single-stranded loop. *J Mol Biol*. 1985;185(3):625-37.
99. Hiasa H, Marians KJ. Topoisomerase III, but not topoisomerase I, can support nascent chain elongation during theta-type DNA replication. *J Biol Chem*. 1994;269(51):32655-9.
100. Smith MT, Wake RG. Definition and polarity of action of DNA replication terminators in *Bacillus subtilis*. *J Mol Biol*. 1992;227(3):648-57.
101. Coskun-Ari FF, Hill TM. Sequence-specific interactions in the Tus-Ter complex and the effect of base pair substitutions on arrest of DNA replication in *Escherichia coli*. *J Biol Chem*. 1997;272(42):26448-56.
102. Lee EH, Kornberg A, Hidaka M, Kobayashi T, Horiuchi T. *Escherichia coli* replication termination protein impedes the action of helicases. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989;86(23):9104-8.
103. Wang JC. DNA topoisomerases: why so many? *J Biol Chem*. 1991;266(11):6659-62.
104. Sundin O, Varshavsky A. Arrest of segregation leads to accumulation of highly intertwined catenated dimers: dissection of the final stages of SV40 DNA replication. *Cell*. 1981;25(3):659-69.
105. Minden JS, Marians KJ. *Escherichia coli* topoisomerase I can segregate replicating pBR322 daughter DNA molecules in vitro. *J Biol Chem*. 1986;261(25):11906-17.
106. Ivancic-Bace I, Howard JA, Bolt EL. Tuning in to interference: R-loops and cascade complexes in CRISPR immunity. *J Mol Biol*. 2012;422(5):607-16.
107. Murakami K, Tsai KL, Kalisman N, Bushnell DA, Asturias FJ, Kornberg RD. Structure of an RNA polymerase II preinitiation complex. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015;112(44):13543-8.
108. Browning DF, Busby SJ. Local and global regulation of transcription initiation in bacteria. *Nat Rev Microbiol*. 2016;14(10):638-50.
109. Ruff EF, Record MT, Jr., Artsimovitch I. Initial events in bacterial transcription initiation. *Biomolecules*. 2015;5(2):1035-62.
110. Korzheva N, Mustaev A, Kozlov M, Malhotra A, Nikiforov V, Goldfarb A, et al. A structural model of transcription elongation. *Science*. 2000;289(5479):619-25.
111. Vassylyev DG, Vassylyeva MN, Perederina A, Tahirov TH, Artsimovitch I. Structural basis for transcription elongation by bacterial RNA polymerase. *Nature*. 2007;448(7150):157-62.
112. Kireeva M, Kashlev M, Burton ZF. Translocation by multi-subunit RNA polymerases. *Biochim Biophys Acta*. 2010;1799(5-6):389-401.
113. Yuzenkova Y, Zenkin N. Central role of the RNA polymerase trigger loop in intrinsic RNA hydrolysis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(24):10878-83.
114. Roberts JW, Yarnell W, Bartlett E, Guo J, Marr M, Ko DC, et al. Antitermination by bacteriophage lambda Q protein. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 1998;63:319-25.

115. Imashimizu M, Oshima T, Lubkowska L, Kashlev M. Direct assessment of transcription fidelity by high-resolution RNA sequencing. *Nucleic Acids Res.* 2013;41(19):9090-104.
116. Landick R, Carey J, Yanofsky C. Translation activates the paused transcription complex and restores transcription of the trp operon leader region. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1985;82(14):4663-7.
117. Komissarova N, Kashlev M. RNA polymerase switches between inactivated and activated states By translocating back and forth along the DNA and the RNA. *J Biol Chem.* 1997;272(24):15329-38.
118. Laptenko O, Lee J, Lomakin I, Borukhov S. Transcript cleavage factors GreA and GreB act as transient catalytic components of RNA polymerase. *EMBO J.* 2003;22(23):6322-34.
119. Proshkin S, Rahmouni AR, Mironov A, Nudler E. Cooperation between translating ribosomes and RNA polymerase in transcription elongation. *Science.* 2010;328(5977):504-8.
120. Yarnell WS, Roberts JW. Mechanism of intrinsic transcription termination and antitermination. *Science.* 1999;284(5414):611-5.
121. Chan CL, Wang D, Landick R. Multiple interactions stabilize a single paused transcription intermediate in which hairpin to 3' end spacing distinguishes pause and termination pathways. *J Mol Biol.* 1997;268(1):54-68.
122. Komissarova N, Becker J, Solter S, Kireeva M, Kashlev M. Shortening of RNA:DNA hybrid in the elongation complex of RNA polymerase is a prerequisite for transcription termination. *Mol Cell.* 2002;10(5):1151-62.
123. Sekine S, Murayama Y, Svetlov V, Nudler E, Yokoyama S. The ratcheted and ratchetable structural states of RNA polymerase underlie multiple transcriptional functions. *Mol Cell.* 2015;57(3):408-21.
124. Weixlbaumer A, Leon K, Landick R, Darst SA. Structural basis of transcriptional pausing in bacteria. *Cell.* 2013;152(3):431-41.
125. Peters JM, Mooney RA, Kuan PF, Rowland JL, Keles S, Landick R. Rho directs widespread termination of intragenic and stable RNA transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106(36):15406-11.
126. Lowery-Goldhammer C, Richardson JP. An RNA-dependent nucleoside triphosphate phosphohydrolase (ATPase) associated with rho termination factor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1974;71(5):2003-7.
127. Park JS, Roberts JW. Role of DNA bubble rewinding in enzymatic transcription termination. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103(13):4870-5.
128. Richardson JP. Rho-dependent termination and ATPases in transcript termination. *Biochim Biophys Acta.* 2002;1577(2):251-60.
129. Peters JM, Mooney RA, Grass JA, Jessen ED, Tran F, Landick R. Rho and NusG suppress pervasive antisense transcription in *Escherichia coli*. *Genes Dev.* 2012;26(23):2621-33.
130. Drolet M, Bi X, Liu LF. Hypernegative supercoiling of the DNA template during transcription elongation in vitro. *J Biol Chem.* 1994;269(3):2068-74.
131. Yu K, Lieber MR. Nucleic acid structures and enzymes in the immunoglobulin class switch recombination mechanism. *DNA Repair (Amst).* 2003;2(11):1163-74.
132. Lee DY, Clayton DA. Properties of a primer RNA-DNA hybrid at the mouse mitochondrial DNA leading-strand origin of replication. *J Biol Chem.* 1996;271(39):24262-9.

133. Masukata H, Tomizawa J. A mechanism of formation of a persistent hybrid between elongating RNA and template DNA. *Cell*. 1990;62(2):331-8.
134. Wang JC. Interactions between twisted DNAs and enzymes: the effects of superhelical turns. *J Mol Biol*. 1974;87(4):797-816.
135. Richardson JP. Attachment of nascent RNA molecules to superhelical DNA. *J Mol Biol*. 1975;98(3):565-79.
136. Daube SS, von Hippel PH. RNA displacement pathways during transcription from synthetic RNA-DNA bubble duplexes. *Biochemistry*. 1994;33(1):340-7.
137. Drolet M, Broccoli S, Rallu F, Hraiky C, Fortin C, Masse E, et al. The problem of hypernegative supercoiling and R-loop formation in transcription. *Front Biosci*. 2003;8:d210-21.
138. Hud NV, Plavec J. A unified model for the origin of DNA sequence-directed curvature. *Biopolymers*. 2003;69(1):144-58.
139. Rabhi M, Espeli O, Schwartz A, Cayrol B, Rahmouni AR, Arluisson V, et al. The Sm-like RNA chaperone Hfq mediates transcription antitermination at Rho-dependent terminators. *EMBO J*. 2011;30(14):2805-16.
140. Dudas KC, Kreuzer KN. UvsW protein regulates bacteriophage T4 origin-dependent replication by unwinding R-loops. *Mol Cell Biol*. 2001;21(8):2706-15.
141. Drolet M. Growth inhibition mediated by excess negative supercoiling: the interplay between transcription elongation, R-loop formation and DNA topology. *Mol Microbiol*. 2006;59(3):723-30.
142. Gowrishankar J, Harinarayanan R. Why is transcription coupled to translation in bacteria? *Mol Microbiol*. 2004;54(3):598-603.
143. Baaklini I, Hraiky C, Rallu F, Tse-Dinh YC, Drolet M. RNase HI overproduction is required for efficient full-length RNA synthesis in the absence of topoisomerase I in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol*. 2004;54(1):198-211.
144. Baaklini I, Usongo V, Nolent F, Sanscartier P, Hraiky C, Drlica K, et al. Hypernegative supercoiling inhibits growth by causing RNA degradation. *J Bacteriol*. 2008;190(22):7346-56.
145. von Meyenburg K, Hansen FG, Nielsin LD, Riise E. Origin of replication, oriC, or the *Escherichia coli* chromosome on specialized transducing phages lambda asn. *Mol Gen Genet*. 1978;160(3):287-95.
146. Kogoma T, Lark KG. Characterization of the replication of *Escherichia coli* DNA in the absence of protein synthesis: stable DNA replication. *J Mol Biol*. 1975;94(2):243-56.
147. Kogoma T. Stable DNA replication: interplay between DNA replication, homologous recombination, and transcription. *Microbiol Mol Biol Rev*. 1997;61(2):212-38.
148. Kogoma T. A novel *Escherichia coli* mutant capable of DNA replication in the absence of protein synthesis. *J Mol Biol*. 1978;121(1):55-69.
149. Ogawa T, Pickett GG, Kogoma T, Kornberg A. RNase H confers specificity in the dnaA-dependent initiation of replication at the unique origin of the *Escherichia coli* chromosome in vivo and in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1984;81(4):1040-4.
150. Hausen P, Stein H. Ribonuclease H. An enzyme degrading the RNA moiety of DNA-RNA hybrids. *Eur J Biochem*. 1970;14(2):278-83.
151. Tadokoro T, Kanaya S. Ribonuclease H: molecular diversities, substrate binding domains, and catalytic mechanism of the prokaryotic enzymes. *FEBS J*. 2009;276(6):1482-93.

152. Hiller B, Achleitner M, Glage S, Naumann R, Behrendt R, Roers A. Mammalian RNase H2 removes ribonucleotides from DNA to maintain genome integrity. *J Exp Med*. 2012;209(8):1419-26.
153. Petzold C, Marceau AH, Miller KH, Marqusee S, Keck JL. Interaction with Single-stranded DNA-binding Protein Stimulates Escherichia coli Ribonuclease HI Enzymatic Activity. *J Biol Chem*. 2015;290(23):14626-36.
154. von Meyenburg K, Boye E, Skarstad K, Koppes L, Kogoma T. Mode of initiation of constitutive stable DNA replication in RNase H-defective mutants of Escherichia coli K-12. *J Bacteriol*. 1987;169(6):2650-8.
155. Maduiké NZ, Tehranchi AK, Wang JD, Kreuzer KN. Replication of the Escherichia coli chromosome in RNase HI-deficient cells: multiple initiation regions and fork dynamics. *Mol Microbiol*. 2014;91(1):39-56.
156. Dimude JU, Stockum A, Midgley-Smith SL, Upton AL, Foster HA, Khan A, et al. The Consequences of Replicating in the Wrong Orientation: Bacterial Chromosome Duplication without an Active Replication Origin. *MBio*. 2015;6(6):e01294-15.
157. Salic A, Mitchison TJ. A chemical method for fast and sensitive detection of DNA synthesis in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(7):2415-20.
158. Kogoma T, Skarstad K, Boye E, von Meyenburg K, Steen HB. RecA protein acts at the initiation of stable DNA replication in rnh mutants of Escherichia coli K-12. *J Bacteriol*. 1985;163(2):439-44.
159. Kogoma T, Barnard KG, Hong X. RecA, Tus protein and constitutive stable DNA replication in Escherichia coli rnhA mutants. *Mol Gen Genet*. 1994;244(5):557-62.
160. Masai H, Asai T, Kubota Y, Arai K, Kogoma T. Escherichia coli PriA protein is essential for inducible and constitutive stable DNA replication. *EMBO J*. 1994;13(22):5338-45.
161. Kogoma T, Maldonado RR. DNA polymerase I in constitutive stable DNA replication in Escherichia coli. *J Bacteriol*. 1997;179(7):2109-15.
162. Masai H, Arai K. Mechanisms of primer RNA synthesis and D-loop/R-loop-dependent DNA replication in Escherichia coli. *Biochimie*. 1996;78(11-12):1109-17.
163. Sandler SJ. Requirements for replication restart proteins during constitutive stable DNA replication in Escherichia coli K-12. *Genetics*. 2005;169(4):1799-806.
164. Zhu Q, Pongpech P, DiGate RJ. Type I topoisomerase activity is required for proper chromosomal segregation in Escherichia coli. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98(17):9766-71.
165. Usongo V, Martel M, Balleydier A, Drolet M. Mutations reducing replication from R-loops suppress the defects of growth, chromosome segregation and DNA supercoiling in cells lacking topoisomerase I and RNase HI activity. *DNA Repair (Amst)*. 2016;40:1-17.
166. Rudolph CJ, Upton AL, Stockum A, Nieduszynski CA, Lloyd RG. Avoiding chromosome pathology when replication forks collide. *Nature*. 2013;500(7464):608-11.
167. Wang X, Lesterlin C, Reyes-Lamothe R, Ball G, Sherratt DJ. Replication and segregation of an Escherichia coli chromosome with two replication origins. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108(26):E243-50.
168. Rudolph CJ, Upton AL, Harris L, Lloyd RG. Pathological replication in cells lacking RecG DNA translocase. *Mol Microbiol*. 2009;73(3):352-66.
169. Rudolph CJ, Upton AL, Briggs GS, Lloyd RG. Is RecG a general guardian of the bacterial genome? *DNA Repair (Amst)*. 2010;9(3):210-23.

170. Horiuchi T, Fujimura Y, Nishitani H, Kobayashi T, Hidaka M. The DNA replication fork blocked at the Ter site may be an entrance for the RecBCD enzyme into duplex DNA. *J Bacteriol.* 1994;176(15):4656-63.
171. Itaya M, Crouch RJ. A combination of RNase H (rnh) and recBCD or sbcB mutations in *Escherichia coli* K12 adversely affects growth. *Mol Gen Genet.* 1991;227(3):424-32.
172. Smith GR. Homologous recombination in procaryotes. *Microbiol Rev.* 1988;52(1):1-28.
173. Horiuchi T, Nishitani H, Kobayashi T. A new type of *E. coli* recombinational hotspot which requires for activity both DNA replication termination events and the Chi sequence. *Adv Biophys.* 1995;31:133-47.
174. Wendel BM, Courcelle CT, Courcelle J. Completion of DNA replication in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014;111(46):16454-9.
175. Nurse P, Levine C, Hassing H, Marians KJ. Topoisomerase III can serve as the cellular decatenase in *Escherichia coli*. *J Biol Chem.* 2003;278(10):8653-60.
176. Perez-Cheeks BA, Lee C, Hayama R, Marians KJ. A role for topoisomerase III in *Escherichia coli* chromosome segregation. *Mol Microbiol.* 2012;86(4):1007-22.
177. Win TZ, Mankouri HW, Hickson ID, Wang SW. A role for the fission yeast Rqh1 helicase in chromosome segregation. *J Cell Sci.* 2005;118(Pt 24):5777-84.

## **Annexe I : Article publié non abordé dans ce mémoire**

**Mutations reducing replication from R-loops suppress the defects of growth, chromosome segregation and DNA supercoiling in cells lacking topoisomerase I and RNase HI activity.**

**Titre courant: Gènes impliqués de la réplication à partir des R-loops**

Valentine Usongo, Makisha Martel, Aurélien Balleydier and Marc Drolet\*.

**Mots clés :** *topA*, topoisomérase I, gyrase, RNase HI, ségrégation

## Contributions

Pour les études menées dans cet article, j'ai réalisé la courbe de croissance des différents supresseurs présentés dans la figure 3. Ces résultats sont importants afin de démontrer que la suppression de ces gènes corrige les défauts de croissance d'un double mutant *topA rnhA*. J'ai également effectué les résultats de cytométrie en flux des figures 4 et 8 qui mettent en évidence la capacité de ces gènes supresseurs à réduire le cSDR chez un mutant *rnhA*. Ces résultats étaient essentiels afin de faire un lien entre la correction des défauts de croissance et la réduction du cSDR. Finalement, j'ai aussi réalisé des résultats de cytométrie de la figure 9 qui montre la réplication de type cSDR chez le double mutant *topA rnhA*. Ces résultats sont importants afin d'effectuer un lien entre les défauts de croissance et de ségrégation de ce double mutant avec le cSDR.



## Abstract

R-loop formation occurs when the nascent RNA hybridizes with the template DNA strand behind the RNA polymerase. R-loops affect a wide range of cellular processes and their use as origins of replication was the first function attributed to them. In *E. coli*, R-loop formation is promoted by the ATP-dependent negative supercoiling activity of gyrase (*gyrA* and *gyrB*) and is inhibited by topoisomerase (topo) I (*topA*) relaxing transcription-induced negative supercoiling. RNase HI (*rnhA*) degrades the RNA moiety of R-loops. The depletion of RNase HI activity in *topA* null mutants was previously shown to lead to extensive DNA relaxation, due to DNA gyrase inhibition, and to severe growth and chromosome segregation defects that were partially corrected by overproducing topo III (*topB*). Here, DNA gyrase assays in crude cell extracts showed that the ATP-dependent activity (supercoiling) of gyrase but not its ATP-independent activity (relaxation) was inhibited in *topA* null cells lacking RNase HI. To characterize the cellular event(s) triggered by the absence of RNase HI, we performed a genetic screen for suppressors of the growth defect of *topA rnhA* null cells. Suppressors affecting genes in replication (*holC2::aph* and *dnaT18::aph*) nucleotide metabolism (*dcd49::aph*), RNA degradation (*rne59::aph*) and fimbriae synthesis (*fimD22::aph*) were found to reduce replication from R-loops and to restore supercoiling, thus pointing to a correlation between R-loop-dependent replication in *topA rnhA* mutants and the inhibition of gyrase activity and growth. Interestingly, the position of *fimD* on the *E. coli* chromosome corresponds to the site of one of the five main putative origins of replication from R-loops in *rnhA* null cells recently identified by next-generation sequencing, thus suggesting that the *fimD22::aph* mutation inactivated one of these origins. Furthermore, we show that topo III overproduction is unable to complement the growth defect of *topA rnhA* null mutants at low temperatures that stabilizes hyper-negatively supercoiled DNA.

## Introduction

During transcription, the nascent RNA is displaced from the template strand via the RNA exit channel of the RNA polymerase (RNAP) and can then be used for its normal function (1). However, the negative supercoiling level generated behind the moving RNAP (2) may promote its reannealing with the template strand, thus leading to R-loop formation (3, 4). R-loop formation was initially detected in *E. coli topA* mutants (5, 6). Since then, genome-wide studies have revealed their occurrence throughout the genome of several organisms from yeast to human (7-10). R-loops can have both beneficial and detrimental effects. They have been shown to be involved in replication, gene expression, Ig class switch recombination, induction of genome instability and, more recently, to be associated with neurodegenerative diseases (7-11).

The first function attributed to an R-loop, its use as an origin of replication for ColE1 plasmids in *E. coli*, was reported more than 30 years ago (12). At the same time, a mutation activating constitutive stable DNA replication (cSDR) in *E. coli* was mapped in the *rnhA* gene (13). This replication, as opposed to the normal one from the chromosomal origin *oriC*, could continue for several hours following the complete inhibition of protein synthesis (14, 15). It was therefore hypothesized that cSDR was initiated outside of *oriC*, from an R-loop that could persist due to the absence of RNase HI. This was supported by the findings that *rnhA* mutants could survive in the absence of the *oriC*/DnaA system and that RNase HI was required as a specificity factor, to inhibit non-*oriC* replication that could occur in a reconstituted DnaA/*oriC* replication system (13). Very recently, the use of next-generation sequencing (NGS) has allowed the identification of five main putative origins of cSDR on the chromosome of *rnhA* null cells (16, 17).

The recent observation that RNase HI-sensitive SDR is activated in *topA* mutants (18) is consistent with the notion that cSDR is initiated from R-loops. Indeed, a major function of topo I is to relax transcription-induced negative supercoiling to inhibit R-loop formation that may otherwise lead to hypernegative supercoiling with the consequence of inhibiting gene expression and growth (3, 19). Furthermore, cSDR was recently shown to be toxic for *topA* null cells that also lack the *topB* gene encoding topo III, the other type 1A topo in *E. coli* (18, 20). These studies also suggested an important function of topo I in chromosome segregation

during cSDR, a function independent of its role in supercoiling regulation. Until very recently, SDR was also believed to originate from R-loops in *recG* mutant. Indeed, RecG is a helicase that can disrupt R-loops (21) and inhibit ColE1 replication (22). However, experimental evidence suggests that SDR in *recG* mutants is initiated at intermediates resulting from replication fork fusion (17, 23). Evidence for replication from R-loops in non-growing wild-type cells has recently been presented (24). This replication was shown to initiate DNA breakage and genome instability (mutations and DNA amplification) which may suggest an important role for cSDR in the genetic adaptation of bacterial cells to stressful conditions (24). Thus, although replication from R-loops can occur in *E. coli* and may sometimes be beneficial, it can also have detrimental effects.

Negative supercoils are introduced into the bacterial chromosome by the ATP-dependent activity of DNA gyrase, a type IIA topoisomerase (25). In the absence of ATP, gyrase can relax negatively supercoiled DNA. DNA gyrase is made up of two GyrA subunits and two GyrB subunits, respectively encoded by the *gyrA* and *gyrB* genes. The GyrA subunit contains the catalytic center of the enzyme whereas the GyrB subunit harbors the ATPase activity. The negative supercoiling introduced by DNA gyrase is required for DNA opening at *oriC*, a process mediated by DnaA to initiate chromosomal DNA replication (26). Such supercoiling also promotes DNA condensation, a prerequisite for bacterial chromosome segregation (27). DNA gyrase activity is also required in front of the replication fork to convert the positive supercoils into negative ones, in order to facilitate fork progression.

In addition, an important interplay exists between transcription and DNA gyrase that is largely responsible for the maintenance of the chromosomal DNA supercoiling level (28). Indeed, as is the case for replication, the process of transcription generates positive supercoils, which are hot-spots for DNA gyrase activity that converts them into negative supercoils. In turn, these negative supercoils facilitate transcription elongation (28). Similarly, the elongation of R-loops that have been initiated behind RNAP, generates positive supercoils that are converted into negative ones by gyrase. In the absence of topo I this process leads to the accumulation of hyper-negatively supercoiled DNA that further stimulates R-loop initiation and elongation (29). Such growth-inhibitory hypernegative supercoiling explain at least in part why *topA* mutants need to acquire compensatory mutations that often map in *gyrA* or *gyrB*, in order to grow (30, 31). Moreover, RNase HI overproduction can partially compensate for the

absence of topo I and inhibit the accumulation of hyper-negatively supercoiled DNA (3, 6). Thus gyrase, via its ATP-dependent supercoiling activity, can facilitate the accumulation of R-loops by promoting both their initiation and their elongation (29).

The cellular ATP/ADP ratio also plays an important role in the regulation of the chromosomal supercoiling level, especially when cells are exposed to various stressful conditions, such as heat shock, salt shock and transition to anaerobic growth (32-34). The ATP/ADP ratio has also been shown to influence the supercoiling level achieved by DNA gyrase *in vitro* (35). Supercoiling is believed to act as a second messenger by relaying environmental signals to regulatory circuits in the cell (36). One of the two major classes of drugs targeting DNA gyrase, the aminocoumarins (e.g. novobiocin), inhibits the ATP-dependent supercoiling activity, but not the ATP-independent relaxation activity of DNA gyrase. Thus, the ATPase activity of gyrase is an important target for the regulation of cellular physiology.

It has been shown that *topA* and *rnhA* null mutations are incompatible unless RNase HI or topo III were produced from a plasmid-borne gene (6, 37). This incompatibility was originally explained by R-loop formation that would rapidly lead to the accumulation of gyrase-mediated hyper-negatively supercoiled DNA and growth inhibition (see above). However, the reverse situation was observed, i.e., the depletion of RNase HI activity in *topA* null cells was shown to lead to extensive DNA relaxation. This was found to be unrelated to changes in the cellular concentration of gyrase or topo IV (the other relaxing enzyme in *E. coli*) or to transcription-induced supercoiling. Rather, this extensive DNA relaxation was shown to be related to the inhibition of gyrase activity both in crude cell extracts and *in vivo*. Moreover, a strong chromosome segregation defect that could be corrected by overproducing topo III, an enzyme that can perform DNA decatenation, was observed in *topA* null cells lacking RNase HI activity (37). However, overproducing topo III had no effects on the DNA supercoiling level in *topA rnhA* null cells. Substituting the *gyrB*(Ts) allele present in our *topA rnhA* null mutants for a *gyrB*<sup>+</sup> one, partially restored the supercoiling level and corrected both the chromosome segregation and growth defects, thus showing that gyrase inhibition was at least partially responsible for the strong phenotypes of *topA rnhA* null mutants (38).

Although our results revealed that cells lacking two major regulators of R-loop formation, topo I and RNase HI, suffered from severe supercoiling, chromosome segregation

and growth defects, they did not address the mechanism responsible for these problems. Importantly, whether these phenotypes were mediated through R-loops and, if it was the case, whether R-loops were directly or indirectly involved, was not addressed in our previous study. Here, our data demonstrate that the absence of RNase HI in *topA* null cells inhibits the ATP-dependent supercoiling activity of gyrase, but not its ATP-independent relaxation activity. To better understand the mechanism(s) responsible for the strong phenotypes of cells lacking topo I and RNase HI, we used a Tn5 mutagenesis system to isolate suppressors of the growth defect of a *topA rnhA* null mutant. Because suppressors from various categories were found to reduce cSDR, our data show that replication from R-loops is highly problematic for cells lacking both topo I and RNase HI and therefore suggest that this mode of replication is a major mechanism by which R-loops can threaten genome stability. Furthermore, the isolation and characterization of the *fimD22::aph* suppressor provides genetic evidence for the existence of at least one of the five putative origins of cSDR recently mapped by NGS (16, 17). Finally, we show that topo III overproduction is unable to complement the growth defect of our *topA rnhA* null mutants at low temperatures, conditions that were previously shown to promote the stabilization of hyper-negatively supercoiled DNA in *topA* null mutants (39). In the absence of RNase HI, such conditions should promote the extensive accumulation of stable R-loops, independent of the nucleotide sequence (29). This result further supports our hypothesis that when topo III overproduction correct the growth defect of *topA* null cells, it complements an important function of topo I that is unrelated to supercoiling and R-loop regulation.

## Materials and methods

### Bacterial strains and plasmids

Bacterial strains used in this study are all derivatives of *E. coli* K12 and are listed in Table 1 together with the list of plasmids. Details on their source are also given in Table 1. Transductions with P1*vir* were performed as described previously (38) and PCR was used to confirm that the purified transductants were good.

Tableau I. Tableau 1 *E. coli* strains and plasmids used.

Name	Genotype or Relevant Genotype	Reference or Source
PH379	<i>rpsL galK2 ΔtrpE rnhA::cam</i>	(37)
RFM443	<i>rpsL galK2 Δlac74</i>	(6)
RFM475	<i>rpsL galK2 gyrB221 (Cou<sup>r</sup>) gyrB203(Ts) Δlac74 Δ(topA cysB)204</i>	(6)
SB383	RFM475 <i>rnhA::cam zag-3198 ::Tn10kan</i> pPH1243	(37)
MD48	MC4100 <i>dnaA46(Ts) tnaA::Tn10</i>	(20)
JE35	MD48 <i>rnhA::cam</i>	(20)
NF98	SB383 <i>gyrB<sup>+</sup></i>	(38)
PS151	<i>topA20::Tn10 rnhA::cam pBAD18rnhA</i> <i>pGB2nusB::kan gyrB221 (Cou<sup>r</sup>)</i> <i>gyrB203(Ts) zie-3163::Tn10kan</i>	(37)
PS152	<i>topA20::Tn10 pGB2nusB::kan gyrB221</i> <i>(Cou<sup>r</sup>) gyrB203(Ts) zie-3163::Tn10kan</i> RFM443 <i>rnhA::cam</i>	(37)
VU19	VU19 <i>qse54::aph</i>	(18)
AB001	VU19 <i>ygiL65::aph</i>	This work
AB002	VU19 <i>ybgP66::aph</i>	This work
AB003	VU19 <i>fimD22::aph</i>	This work
AB004	VU129 <i>ΔrecQ767::kan</i>	This work
MM101	RFM443 <i>rne59::aph</i>	This work
MM120	RFM443 <i>holC2::aph</i>	This work
MM122	VU19 <i>holC2::aph</i>	This work
MM133	RFM475 <i>rnhA::cam</i> pPH1243	This work
VU129	RFM475 <i>rnhA::cam</i> pBAD18 <i>rnhA</i>	(20)
VU135	VU129 <i>dnaT18::aph</i>	This work
VU148	RFM443 <i>holC2::aph</i>	(20)
VU183	RFM475 <i>pepA39::aph</i>	This work
VU185	RFM475 <i>dnaT18::aph</i>	This work
VU188	MD48 <i>upp31::aph</i>	(20)

VU250	MD48 <i>dcd49::aph</i>	This work
VU325	VU129 <i>holC2::aph</i>	This work
VU600	VU129 <i>oriC15::aph</i>	This work
VU605	VU129 <i>upp31::aph</i>	This work
VU607	VU129 <i>pyrH13::aph</i>	This work
VU609	VU129 <i>pyrG34::aph</i>	This work
VU612	VU129 <i>dcd49::aph</i>	This work
VU615	VU129 <i>cmk70::aph</i>	This work
VU616	VU129 <i>gmk68::aph</i>	This work
VU619	VU129 <i>fimD22::aph</i>	This work
VU620	VU129 <i>qseC54::aph</i>	This work
VU623	VU129 <i>ygiL65::aph</i>	This work
VU625	VU129 <i>ybgP66::aph</i>	This work
VU628	VU129 <i>rne59::aph</i>	This work
VU640	<i>topB</i> gene under the control of the IPTG-inducible <i>P<sub>trc</sub></i> promoter	This work
pPH1243	<i>rnha</i> gene under the control of the arabinose inducible <i>P<sub>BAD</sub></i> promoter	(40)
pBAD18 <i>rnhA</i>	pSC101 derivative	(37)
pGB2 <i>nusB::kan</i>		(37)

### Supercoiling assays in crude cell extracts.

The supercoiling assays in crude cell extracts were performed as described previously (37), except that the concentration of ATP was 6 mM. When DNA relaxation was assayed, no ATP was added to the reactions. When indicated, norfloxacin was added at 200 µg/ml.

### Plasmid extraction and agarose gel electrophoresis for supercoiling analysis.

Plasmid extraction from cells grown in LB was performed as described previously (37). Plasmid topoisomers analysis in agarose gels containing chloroquine was performed as done before (41). The procedure to detect pGB2*nusB::kan* (Fig. 2), pBR322 (Fig. 3) and pPH1243 (Fig. 5A, 7A and S3A) in the dried agarose gels by *in situ* hybridization has also been described (37).

## Insertional mutagenesis

Insertional mutagenesis was performed with pRL27 (42). This plasmid carries a hyperactive Tn5 transposase gene under the control of the *tetA* promoter, and an insertional cassette with a kanamycin resistance gene (*aph*) and a *pir*-dependent origin (*oriR6K*) bracketed by Tn5 inverted repeats. Following electroporation of pRL27 in a *pir*- background, the *kan<sup>r</sup>* cassette inserts randomly into the chromosome. A *topA rnhA gyrB(Ts)/pBAD18rnhA* strain (VU135) was electroporated with pRL27 and plated on LB containing 25 µg/ml kanamycin at 40°C, to select for suppressors that grew in the absence of arabinose (no RNase HI produced). At this temperature, no background growth is detected for this strain in the absence of arabinose. For comparison, a *topA gyrB(Ts)* strain can grow robustly at 42°C because it can complement the Ts phenotype of the *gyrB(Ts)* allele (38). P1*vir* was grown on the *kan<sup>r</sup>* clones that re-grew at 40°C and each phage lysate was used to infect a *topA rnhA gyrB(Ts)/pPH1243* strain (VU129), that normally grows only in the presence of IPTG, to overproduce topo III from pPH1243 (37). Transductants were selected on LB plates containing IPTG and kanamycin (50 µg/ml) at 37°C. Transductants that re-grew in the absence of IPTG were selected for further characterization. To map the site of *aph* insertion in the selected clones, genomic DNA was extracted (43) and digested with *MluI* (no sites for this enzyme in the insertion cassette) before being ligated on itself. The DNA was electroporated into DH5αλ::*pir*<sup>+</sup> cells and selected for kanamycin resistance as described (44). The plasmids were extracted and prepared for sequencing with *ori* 5'-AACAAAGCCAGGGATGTAACG-3' (the *ori* side of the insert) or *aph* 5'-CAGCAACACCTTCTTCACGA-3' (the *aph* side of the insert) primers as described (44).

## EdU incorporation and click-labeling

To detect cSDR, EdU incorporation and click-labeling using the “Click-It<sup>®</sup> Alexa Fluor 448<sup>®</sup> Imaging kit” (Life technologies, molecular probes) were done as described (18). Briefly, the cells were grown in LB medium at 37°C unless otherwise indicated, to an OD<sub>600</sub> of 0.3. EdU incorporation was for 60 min. To detect cSDR the cells were first treated with



spectinomycin for two hours, to allow the termination of replication rounds initiated from *oriC*, before EdU incorporation.

### **Flow cytometry analysis**

For cSDR, the labeled cells were analyzed (at least 10 000 events per sample) with a BD FACSCanto™ II apparatus and data were analyzed by using the BD FACSDiva™ software (BD Biosciences) as described (18).

The procedure for flow cytometry in rifampicin run-out experiments with cells grown in LB medium has been described (38).

## Results

### **The ATP-dependent supercoiling activity of gyrase, but not its ATP-independent supercoiling activity, is inhibited in *topA rnhA* null mutants.**

We have previously shown that the ATP-dependent supercoiling activity in crude cell extracts of *topA* null cells was strongly inhibited when the *rnhA* gene was also deleted, despite the fact that the amount of GyrA and GyrB proteins were found to be similar whether or not *rnhA* was absent (37). These results suggested the presence of inhibitory factor(s) in cell extracts of double *topA rnhA* null cells, which was further supported by the finding that these extracts could significantly inhibit ATP-dependent supercoiling activity in wild-type extracts (37).

In our previous work, the supercoiling activity detected in extracts of *topA* null cells was found to be relatively weak (37). Here, we have improved the assay by optimizing the amount of ATP added to the extracts (Fig. S1), and we now present a time course experiment showing that the ATP-dependent supercoiling activity was much lower when the *topA* null cells were also deleted for *rnhA* (Fig.1A compare SB383 ( $\Delta topA$ , *rnhA::cam*) with RFM475 ( $\Delta topA$ )). Next, we measured the ATP-independent relaxation activity in extracts of *topA* null and *topA rnhA* null strains. The level of this activity was found to be very similar in extracts from both strains (Fig. 1B, bottom panel, compare *topA rnhA* (PS151) with *topA* (PS152)), despite the fact that the supercoiling activity was much higher in the extract of *topA* null cells, as expected (Fig. 1B, top panel). The observed DNA relaxation could not be due to topo IV, as this enzyme requires ATP for activity. As well, topo III activity was unlikely to be involved, as this topo plays no role in supercoiling regulation and is a protein of very low abundance (45, 46). To confirm that gyrase was responsible for the ATP-independent relaxation activity, we added norfloxacin, a DNA gyrase inhibitor, to the cell extracts. Fig. 1C shows that norfloxacin inhibited the DNA relaxation activity in cellular extracts from both *topA* null and *topA rnhA* null strains (compare top panel, - norfloxacin with bottom panel, + norfloxacin). Altogether, our results indicate that the ATP-dependent supercoiling activity of gyrase, but not its ATP-independent relaxation activity, is inhibited in extracts of *topA* null cells which also lack the *rnhA* gene.

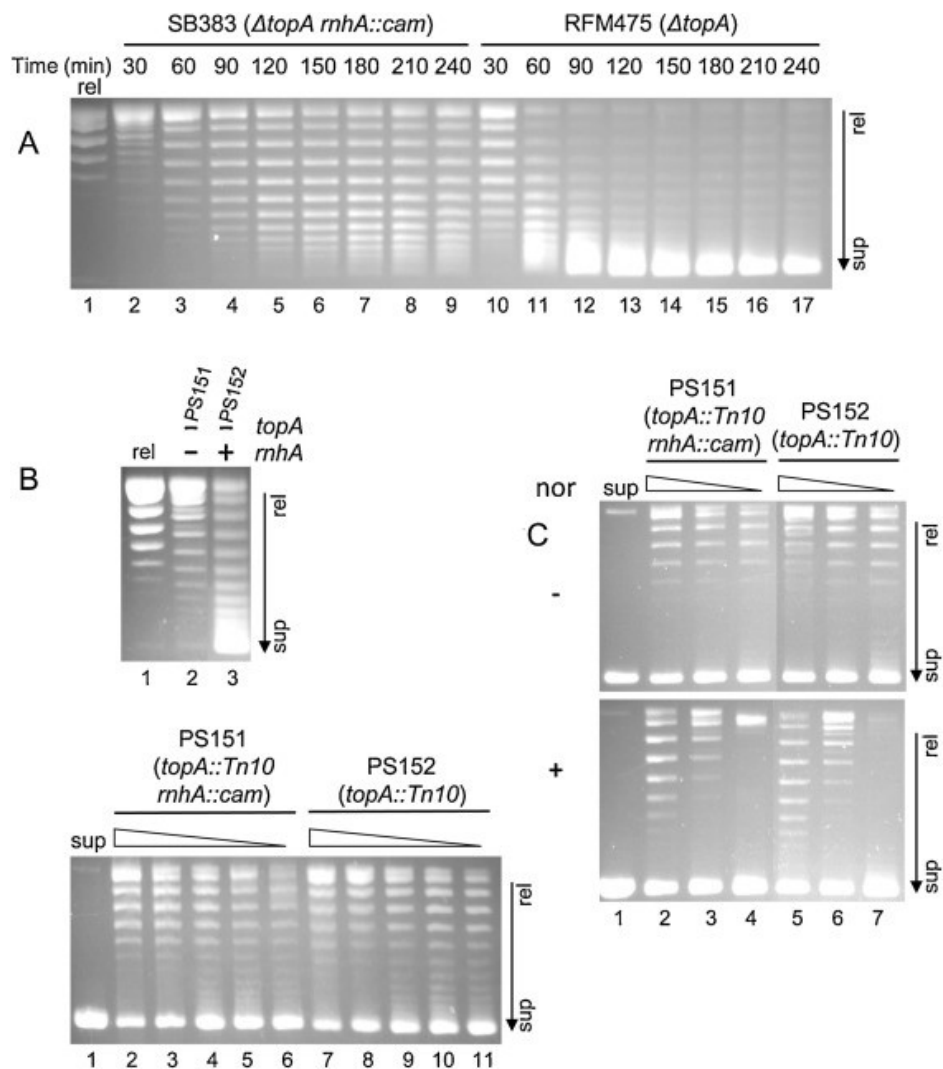


Figure 1. The ATP-dependent supercoiling activity of gyrase, but not its ATP-independent relaxation activity, is inhibited in crude cells extracts of a *topA* mutant lacking RNase HI.

Crude cell extracts were prepared and used for supercoiling assays as described in Material and methods. (A) Time course experiment with extracts (12  $\mu$ g of proteins) from isogenic SB383 ( $\Delta topA rnhA::cam gyrB(Ts)$ ) and RFM475 ( $\Delta topA gyrB(Ts)$ ) strains. (B) Assays were performed with (top panel, supercoiling) or without (bottom panel, relaxation) ATP and with extracts from isogenic PS151 ( $topA20::Tn10 rnhA::cam gyrB(Ts)$ ) and PS152 ( $topA20::Tn10 gyrB(Ts)$ ) strains. In the top panel, 12  $\mu$ g of proteins were used, whereas in the bottom panel decreasing amount of proteins (1/2 dilutions) starting from 12  $\mu$ g were used in lanes 2 to 6 and 7 to 11. (C) Assays with extracts from isogenic PS151 ( $topA20::Tn10 rnhA::cam gyrB(Ts)$ ) and PS152 ( $topA20::Tn10 gyrB(Ts)$ ) strains in the absence of ATP (relaxation) and

*in the presence of decreasing amount of proteins (1/2 dilutions), starting from 12 µg. In the bottom panel, norfloxacin (nor) was added at 200 µg/ml in the reactions. The arrows indicate that the supercoiled topoisomers (sup) migrated more rapidly than the relaxed (rel) ones during electrophoresis in the agarose gel.*

In the next series of experiments, plasmid DNA was extracted for supercoiling analysis (pGB2*nusB::kan*) from *topA null* and *topA rnhA null* cells after a temperature downshift from 37 to 28°C. The *topA rnhA null* strain also carries pBAD18*rnhA* with the *rnhA* gene under the control of the arabinose-inducible P<sub>BAD</sub> promoter. All the *topA null* strains used in the present study carry a mutated *gyrB* allele harboring two mutations, with one of them, *gyrB221*, conferring resistance to coumestrol (see discussion) and the other one, *gyrB203*, conferring a thermo-sensitive (Ts) phenotype. Because of the Ts phenotype, gyrase activity is sufficiently reduced at 37°C to allow the growth of a strain carrying a *topA null* mutation. However, at 28°C, gyrase activity is restored and, as a result, *topA null* cells accumulate R-loop-dependent hyper-negatively supercoiled DNA that inhibits growth (3, 6, 19). We reasoned that if the supercoiling activity of gyrase was strongly inhibited in *topA rnhA null* cells, its relaxation activity, but not its supercoiling activity, should be stimulated by a temperature downshift, which should therefore result in the accumulation of extensively relaxed plasmid DNA. Fig. 2A shows that this turned out to be the case. Indeed, whereas hyper-negatively supercoiled DNA clearly accumulated in the *topA null* strains in the time interval between 2 and 60 min. after the downshift (lanes 2 to 4, top panel, [--]), during the same period of time, extensively relaxed DNA accumulated in the *topA rnhA null* strain cultivated in the absence of arabinose (lanes 10 to 12, top panel, [rel]). In fact, very few hyper-negatively supercoiled topoisomers were detected in the double mutant grown in the absence of arabinose (lanes 11 to 16, top panel, [--]). Two-D gel electrophoresis (Fig. 2B; see also ref.) confirmed the identity of the hyper-negatively and relaxed topoisomers respectively labeled [--] and [rel] in Fig. 2A.

When a limited amount of RNase HI could be synthesized (0.005% arabinose) in the double *topA rnhA null* mutant, larger amounts of hyper-negatively supercoiled topoisomers were produced as compared to relaxed ones, and they were still detected 240 min after the temperature downshift (Fig. 2A, bottom panel, lanes 3 to 8). When RNase HI could be

overproduced (0.05% arabinose), very few relaxed topoisomers were detected and the hyper-negatively supercoiled topoisomers (lower amount as compared to PS152) were eventually relaxed (Fig. 2A, bottom panel, lanes 14 to 16) as previously shown when RNase HI was overproduced in *topA* null mutants (3). Thus, together our *in vitro* and *in vivo* results support the assumption that the lack of RNase HI activity in *topA* null cells leads to the specific inhibition of the ATP-dependent supercoiling activity of gyrase. Furthermore, our *in vivo* data demonstrate the major effect of RNase HI activity on the DNA supercoiling level in *topA* null mutants.

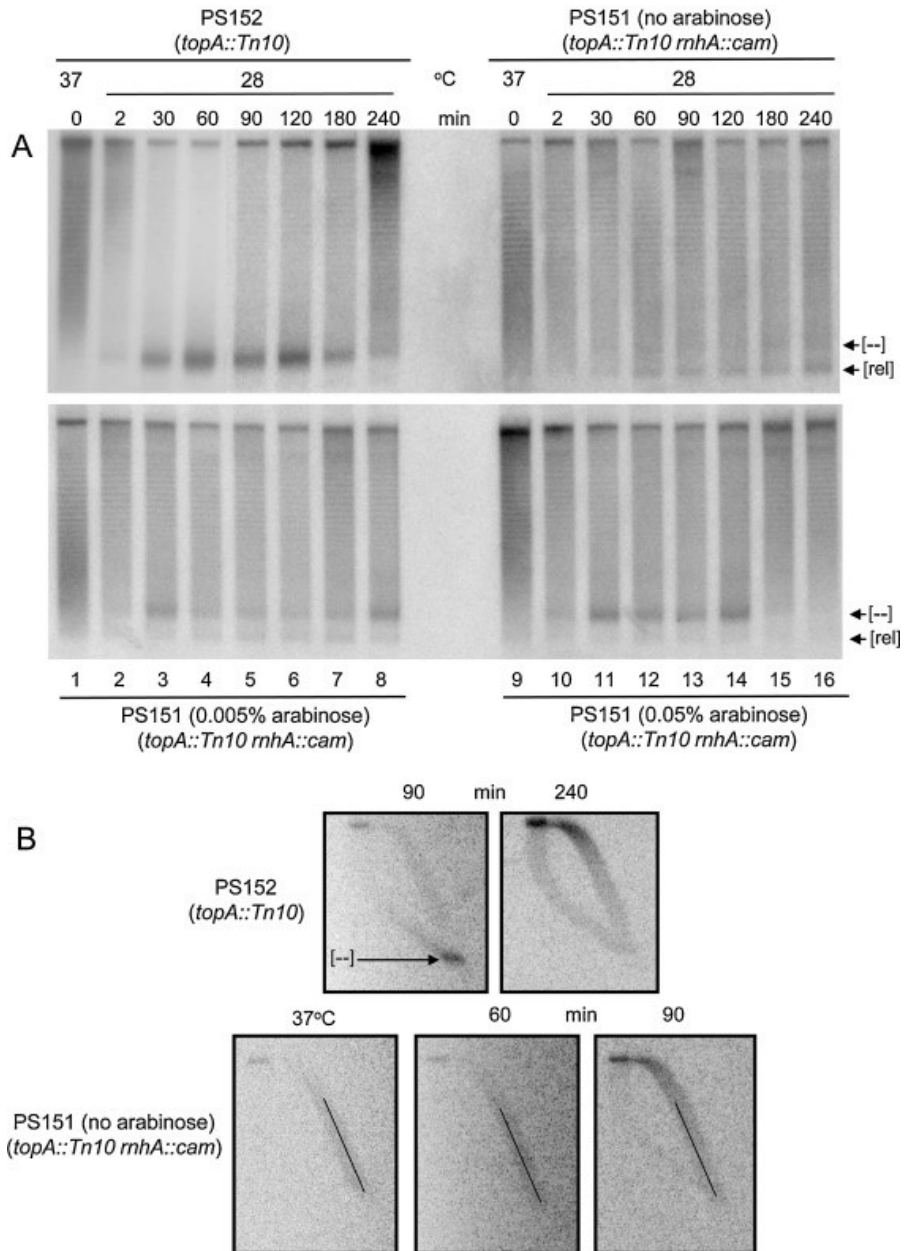


Figure 2. A temperature downshift induces DNA relaxation, not hypernegative supercoiling, in a *topA* null mutant lacking RNase HI.

*PS151 (topA20::Tn10 rnhA::cam gyrB(Ts))* and *PS152 (topA20::Tn10 gyrB(Ts))* cells also carrying *pGB2nusB::kan* were grown in LB (with or without arabinose at the indicated concentration) to log phase at 37°C as described in Material and methods. DNA was extracted just before the temperature downshift and at various times after the downshift (28°C). In (A) DNA samples were loaded on agarose gels for electrophoresis in the presence of chloroquine (7.5 µg/ml). The gels were hybridized with a probe to detect *pGB2nusB::kan*. [-] points to

hyper-negatively supercoiled DNA and [rel] indicates extensively relaxed DNA. In (B), the presence of both hyper-negatively and extensively relaxed topoisomers in various DNA samples was confirmed by performing 2-D gel electrophoresis in the presence of chloroquine (7.5 and 30.0  $\mu\text{g/ml}$  respectively in the first and second dimension). [--] points to hyper-negatively supercoiled DNA and lines are traced over the more relaxed topoisomers.

## Isolation of suppressors of the growth defect of *topA rnhA* null mutants

To characterize the cellular event(s) leading to the strong phenotypes of *topA rnhA* null cells, we used a Tn5 mutagenesis system to isolate suppressors of the growth defect of cells lacking *topA* and *rnhA*, as described in Materials and methods. Table 2 lists the suppressors and indicates the number of independent isolates for each of them. The category “DNA replication and nucleotide metabolism” contains the highest number of independent isolates, thus suggesting that replication was problematic in the absence of both topo I and RNase HI. Interestingly, many of the suppressors affected genes coding for ribonucleases (RNase E and R), a situation that was not observed in previous suppressor screens to isolate mutations correcting replication-related phenotypes (e.g. see (43)). Considering the involvement of RNase HI and topo I in the metabolism of R-loops, the isolation of such suppressors in our study may suggest the occurrence of severe phenotypes related to replication from R-loops in *topA rnhA* null mutants (see below). Suppressors were also found in genes related to cellular functions (e.g. fimbriae synthesis) that have a priori nothing to do with R-loops, supercoiling or chromosome segregation. Clones in the above-mentioned categories were further characterized in this work.

Tableau II. Suppressors of the growth defect of cells lacking *topA* and *rnhA*

<u>Category and genes</u>	<u>No Indep. Isol.</u> <sup>a</sup>	<u>Protein/function</u>
<u>DNA replication and nucleotide metabolism</u>	(19)	
<i>holC</i>	7 <sup>b</sup>	$\chi$ subunit of DNA pol III
<i>oriC</i>	1	Origin of replication
<i>dnaT</i>	1	Primosomal protein DnaT
<i>cmk</i>	2	Cytidylate kinase
<i>pyrH</i>	2	UMP kinase
<i>udk</i>	2	Uridine-cytidine kinase
<i>pyrG</i>	1	CTP synthetase
<i>gmk</i>	1	Guanylate kinase

<i>dcd</i>	1	dCTP deaminase
<i>upp</i>	1	Uracyl phosphoribosyltransferase
<b><u>Ribonucleases</u></b>	<b>(14)</b>	
<i>rne</i>	10	RNase E
<i>rnr</i>	4 <sup>c</sup>	RNase R
<b><u>Fimbriae</u></b>	<b>(3)</b>	
<i>fimD</i>	1	Usher in the type 1 fimbriae
<i>ybgP</i>	1	Putative Usher protein
<i>ygiL</i>	1	Fimbrial-like Adhesin in the fimbrial <i>ygiLyqiGHI</i> operon
<b><u>Regulators</u></b>	<b>(8)</b>	
<i>crp/cya</i>	4	CRP-cAMP DNA binding dual transcriptional regulator
<i>qseC</i>	1	QseC quorum-sensing sensor of the QseC/QseB two-component system
<i>lrhA</i>	1	LysR-homologue A
<i>atoS</i>	1	AtoS sensor histidine kinase of the AtoS/AtoC two-component system
<i>cusR</i>	1	Cu-sensing regulator of the two-component CusS/CusR two-component system.
<b><u>Others</u></b>	<b>(15)</b>	
<i>glnD</i>	2	Uridyl-transferase regulator of nitrogen metabolism
<i>pitB</i>	1	Phosphate transporter
<i>gsp</i>	1	<u>Fused glutathionylspermidine amidase /glutathionylspermidine synthetase</u>
<i>efp</i>	1	Elongation factor P
<i>aceE</i>	1	Subunit of pyruvate dehydrogenase
<i>pta</i>	1	Phosphate acetyltransferase
<i>hdeA</i>	1	Periplasmic chaperone
<i>rfbA</i>	1	dTDP-glucose pyrophosphorylase
<i>wcaD</i>	1	CA polymerase involved in colanic acid synthesis
<i>yjhF</i>	1	Member of the gluconate permease (GntP) family of transporters
<i>yijE</i>	1	Cystine efflux transporter
<i>ynjD</i>	1	ATP-binding component of a predicted metabolite uptake ABC transporter
<i>ybaE</i>	1	Predicted transporter subunit
<i>yghJ</i>	1	Mucin-degrading metalloprotease

## Legende

<sup>a</sup>Number of independent isolates

<sup>b</sup>Five insertions were found in *pepA* which is situated upstream of *holC*, and 2 insertions were found in *holC*. We found that the *holC* gene, but not *pepA*, restored the initial growth defect phenotype of these 7 isolates, when provided on a plasmid (data not shown). A similar situation has been previously described in a work on the isolation of suppressors of the growth defect of a *dnaAcos* mutant (43).



*Two insertions were found in nsrR which is situated upstream of rnr, and 2 insertions were found in rnr. In a previous work about the isolation of suppressors of the growth defect of cells lacking phosphorolytic ribonucleases, insertions in nsrR were found to complement via the downstream rnr gene (47). Although not demonstrated in the present work, we assume that a similar situation is taking place here.*

Fig. 3 shows representative growth curves of some of the suppressor clones (in the VU129 background ( $\Delta topA rnhA::cam$ )) that were further characterized in the present study, together with the control strains VU129 and RFM475 ( $\Delta topA$ ). VU129 carries pPH1243, a plasmid from which the *topB* gene can be overexpressed from the strong IPTG-inducible *P<sub>trc</sub>* promoter (40). We have previously shown that overexpressing *topB* from pPH1243 following the addition of IPTG, corrected both the growth and chromosome segregation defects of a  $\Delta topA rnhA::cam$  strain without, however, restoring supercoiling (37). For the growth curves, cells were grown in the absence of IPTG. It can be seen that the growth of VU129 stopped during log phase, whereas it continued for all the other strains. The best suppressor mutation in term of growth rate was found to be *dnaT18::aph*, whereas the less good was *oriC15::aph*. Thus, all the strains, but VU129, could grow past the log phase, which was consistent with the observation that unlike VU129, the suppressor clones could form colonies on solid media in the absence of IPTG.

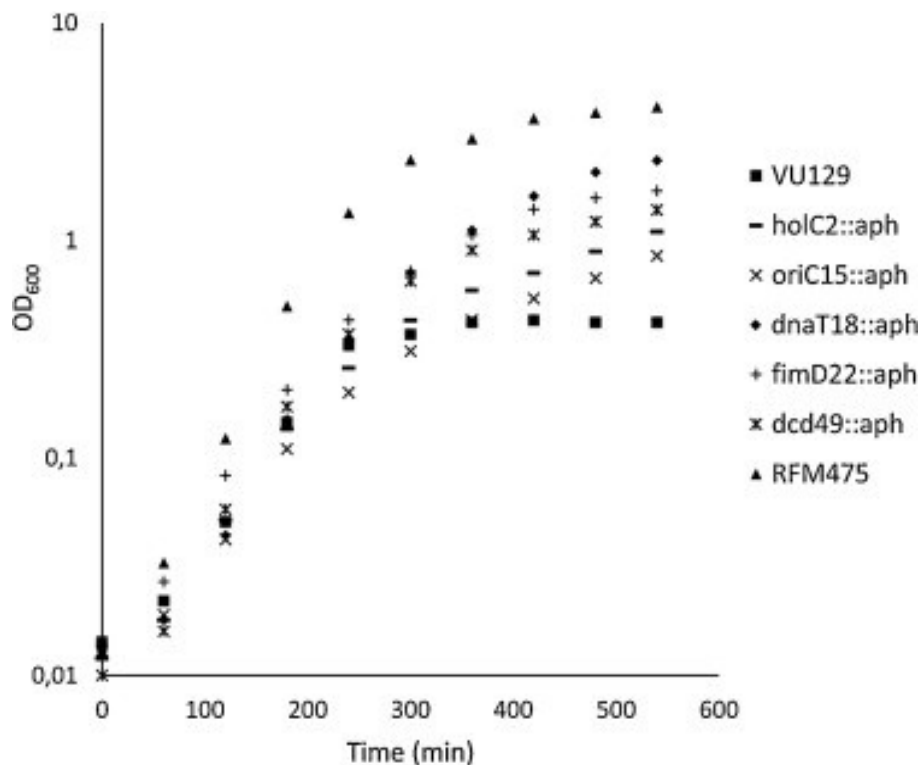


Figure 3. The *topA rnhA* null strain but not the suppressor clones stops growing during log phase in LB medium.

The growth in LB medium of  $\Delta topA gyrB(Ts)$  strain (RFM475) and of  $\Delta topA rnhA::cam gyrB(Ts)$  strain (VU129) and its *holC2::aph* (VU600), *oriC15::aph* (VU605), *dnaT18::aph* (VU148), *fimD22::aph* (VU620) and *dcd49::aph* (VU615) derivatives was followed by measuring absorbance at 600 nm. The results shown are representative of at least three independent experiments.

### Characterization of suppressors affecting genes involved in replication.

Some of the suppressors listed in the first category have recently been partially characterized for their effects on DNA replication. One of the *holC* suppressors, *holC2::aph*, was shown to exacerbate the replication asynchrony phenotype of a *topA* null mutant (20), which demonstrated, as suggested before, that *holC* can affect replication initiation (48). *holC* codes for the  $\chi$  subunit of DNA pol III (the replicative polymerase in bacteria) that interacts with SSB for replisome establishment and maintenance (48). Thus, *holC* is also involved in replication elongation and its inactivation should therefore affect replication whether it is initiated from *oriC* or from R-loops. In fact, our observation that the *holC2::aph* mutation had

a positive effect on the growth of a double *topA topB* null mutant may be explained in the context of R-loop-dependent replication, since the strong phenotypes of this double mutant were recently shown to be related to cSDR (20).

We performed an experiment to directly test the effect of the *holC2::aph* mutation on cSDR, by using our newly developed procedure (18). This procedure was used to show cSDR in *rnhA*, *topA* and *topA topB* null mutants, and its inhibition following the introduction of the *dnaT18::aph* mutation in an *rnhA* null mutant. In this procedure, cells are treated for two hours with the protein synthesis inhibitor spectinomycin, prior to the addition of the nucleotide analog ethynyl-deoxyuridine (EdU) for one hour. During the two hours incubation period in the presence of spectinomycin, replication rounds initiated at *oriC* are fully completed (18). The incorporation of EdU during replication is revealed by “click” labeling with Alexa Fluor<sup>®</sup> 488 dye in fixed cells, and flow cytometry analysis. As a control for replication efficiency in the strain, EdU incorporation is also measured in cells untreated with spectinomycin. In the histograms, the P2 and P3 zones represent respectively non-replicating cells (non-specific binding of Alexa Fluor<sup>®</sup> 488 dye to the cells; the background) and cells actively replicating their DNA. Thus cells undergoing cSDR are found in the P3 zone in the samples treated with spectinomycin. Fig. 4 shows that the *holC2::aph* mutation reproducibly reduced cSDR in the *rnhA::cam* strain (right panels compare *rnhA::cam* strain (73.0%) and *rnhA::cam holC2::aph* strain (two independent experiments, 57.4 and 56.7% respectively)). Thus, the *holC2::aph* mutation also affects replication initiated from R-loops.

We have also characterized the insertion mutant affecting *oriC* (*oric15::aph*) and we found that it strongly exacerbated the replication asynchrony phenotype of a *topA* null mutant. Furthermore, this *oric15::aph* allele was shown to be *oriC*-competent in both *topA* null and *dnaAcos* mutants (20). The *dnaT* insertion mutant, *dnaT18::aph*, was also partially characterized and was found to strongly inhibit cSDR (18, 20). DnaT is one of the various proteins that constitute the primosome allowing the assembly of a replisome outside of *oriC* (e.g. for cSDR; (15)). Therefore, this mutation should not affect replication initiated from *oriC*. In agreement with this assumption, we found that the *dnaT18::aph* mutation had no effects on replication, as measured by flow cytometry, in a wild-type strain (not shown). Furthermore, fig. S2 shows that whereas a mutation affecting the expression of *holC* conferred the replication asynchrony phenotype to a *topA* null mutant as previously demonstrated

(bottom panel, VU185 ( $\Delta topA pepA39::aph$ ) and see Table 2, footnote b), the  $dnaT18::aph$  mutation had no effects (compare RFM475 ( $\Delta topA$ ), top panel, with VU188 ( $\Delta topA dnaT18::aph$ ), middle panel). Thus, out of the three mutations, two are specific, one for *oriC*-dependent replication, *oriC15::aph*, the other one for R-loop-dependent replication,  $dnaT18::aph$ , whereas the third one, *holC2::aph*, affects both types of replication.

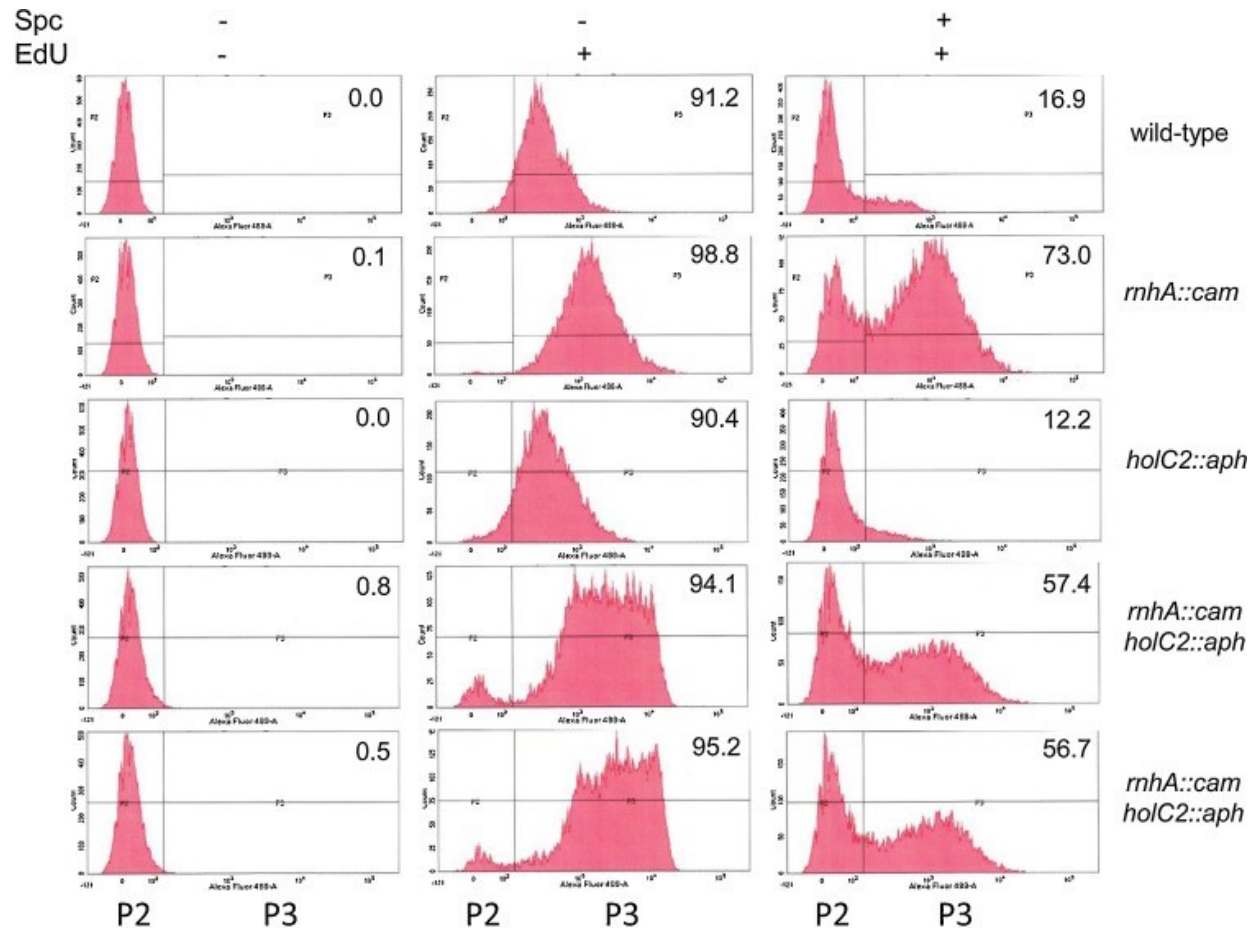


Figure 4. Effects of the *holC2::aph* mutation on cSDR in an *rnhA* null strain.

Cells from wild-type strain (RFM443), *holC2::aph* strain (VU183), *rnhA::cam* strain (VU19) and its *rnhA::cam holC2::aph* derivative (MM133) were grown in LB at 37°C for EdU incorporation as described in Material and methods. Spectinomycin (Spc) at 400 µg/ml was added or not for two hours before EdU incorporation (cSDR measurement). The no EdU cell samples (left panels) were used to define the background (P2 zone; non-specific binding of

Alexa Fluor<sup>®</sup> 488 dye to the cells). The number in the upper right corner of the panels give the percentage of cells incorporating EdU (cells in the P3 zone).

The *holC2::aph*, *oriC15::aph* and *dnaT18::aph* mutations were transferred into the *ΔtopA rnhA::cam* strain, VU129, to study their effects on the supercoiling activity of DNA gyrase. In a previous study, pPH1243 was used as a marker of the gyrase supercoiling activity in the strain (37). Here, this plasmid was similarly used and, as before, gyrase activity was stimulated by adding both IPTG, to induce strong transcriptional activity from the *P<sub>trc</sub>* promoter, and spectinomycin before transferring the cells to 28°C (37). DNA was also extracted from cells grown at 37°C just before the addition of spectinomycin. Fig. 5A shows that the plasmid topoisomers from cells grown at 37°C migrated more toward the relaxed state for VU129 strain (lane 9) and its *oriC15::aph* derivative (lane 3) as compared to VU129 carrying either the *holC2::aph* (lane 1) or *dnaT18::aph* mutation (lane 5), and RFM475 (*ΔtopA*, lane 7), the positive control strain. Consistent with this observation, hyper-negatively supercoiled topoisomers ([-]) were clearly observed when the DNA samples were extracted from cells treated with spectinomycin and transferred to 28°C, in the case of the *holC2::aph* (lane 2) and *dnaT18::aph* (lane 6) derivatives of VU129, and RFM475 (lane 8), as expected. However, no such hyper-negatively supercoiled DNA was observed for VU129 (lane 10) and its *oriC15::aph* derivative (lane 4). Thus, our results suggest a correlation between the inhibition of replication from R-loops (*dnaT18::aph* and *holC2::aph*), and the restoration of the supercoiling activity of gyrase. This is further supported by our results showing that other suppressor mutations affecting cSDR also restored supercoiling (see below).

To study the effect of these suppressor mutations on chromosome segregation in the *ΔtopA rnhA::cam* strain (VU129), we used flow cytometry as previously done to analyze the Par<sup>-</sup> phenotype of a *gyrB(Ts)* strain (38). In this strain, the Par<sup>-</sup> phenotype was found to be highly expressed at 42°C, but absent at 37°C. This phenotype, related to a strong inhibition of the supercoiling activity of gyrase, is characterized by the presence of a high number of both anucleate and long cells. The existence of these cells can be revealed using flow cytometry where anucleate cells are represented by a peak on the left side of the histogram (non-specific binding of the dye) and long cells by DNA labeling detected on the right side of the histogram.

Fig. 5B shows that when VU129 strain and its *oriC15::aph* derivative were grown at 37°C in the absence of IPTG, a large amount of anucleate cells accumulated, whereas for VU129 strain carrying either the *holC2::aph* or the *dnaT18::aph* mutation, a much lower amount of anucleate cells were produced (left panels, anucleate cells indicated by an arrow, compare VU129, VU605, VU600 and VU148). Consistent with this observation, the proportion of DNA labeling detected on the right side of the histogram was higher for VU129 and its *oriC15::aph* derivative as compared to the *holC2::aph* or the *dnaT18::aph* derivatives (left panels, compare VU129, VU605, VU600 and VU148). Thus, as it was shown for the supercoiling defect (Fig. 5A), these results suggest a correlation between the inhibition of replication from R-loops and the correction of the chromosome segregation defects in the *ΔtopA rnhA::cam* null strain. Moreover, the fact the *oriC15::aph* mutation was inefficient in correcting both the supercoiling and chromosome segregation defects in the *ΔtopA rnhA::cam* strain, is consistent with our observation that this mutation only weakly stimulates the growth of this double mutant (Fig. 3 and data not shown).

Fig. 5B, right panels, shows that overproducing topo III (+ IPTG) had a positive effect on chromosome segregation in all strains. Moreover, chromosome segregation still appeared to be better in the *holC2::aph* and *dnaT18::aph* derivatives of VU129 as compared to VU129 and its *oriC15::aph* derivative (right panels, compare VU129, VU605, VU600 and VU148). This result indicates that the positive effects of topo III overproduction and of *holC2::aph* and *dnaT18::aph* mutations are at least partially additive. This could have been due to either the presence of a limiting amount of topo III and/or to the complementation, by topo III overproduction, of a function of topo I in chromosome segregation ((18, 20) and see discussion).

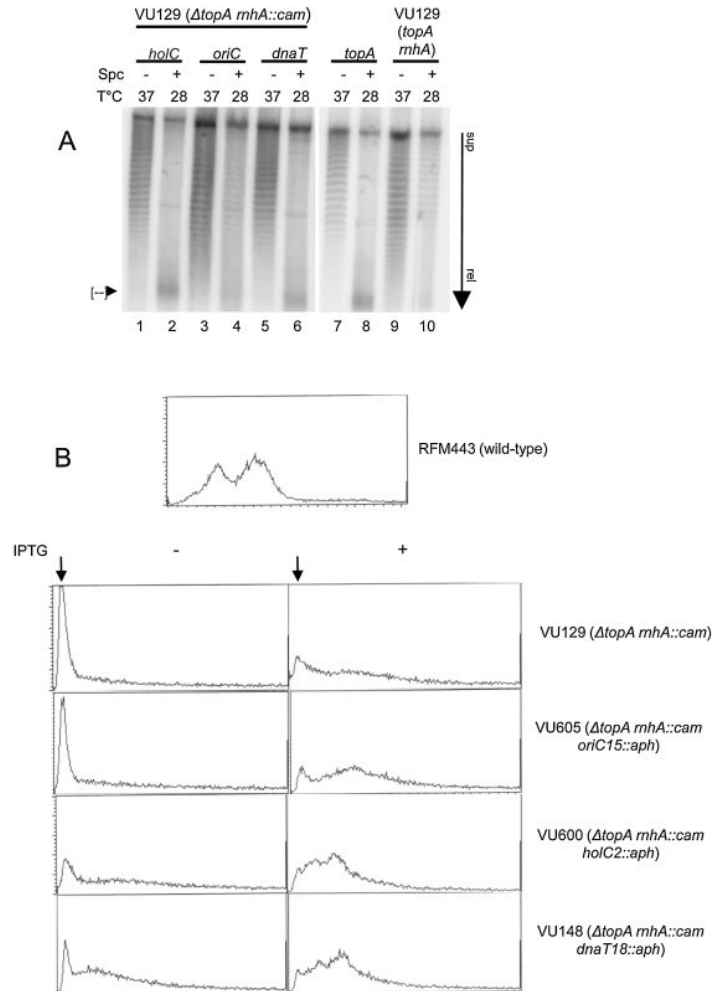


Figure 5. Effects of mutations in genes involved in replication on supercoiling and chromosome segregation in a *topA rnhA gyrB(Ts)* strain.

(A) Cells carrying *pPH1243* from  $\Delta topA$  *gyrB(Ts)* strain (RFM475) and from  $\Delta topA$  *rnhA::cam* *gyrB(Ts)* strain (VU129) and its *holC2::aph* (VU600), *oriC15::aph* (VU605) and *dnaT18::aph* (VU148) derivatives were grown in LB supplemented with IPTG (1mM) to log phase at 37°C, as described in Material and methods. DNA was extracted just before the addition of spectinomycin (Spc) at 400  $\mu$ g/ml and the temperature downshift at 28°C. One hour later DNA was extracted. DNA samples were loaded on an agarose gel for electrophoresis in the presence of chloroquine (7.5  $\mu$ g/ml). The gel was hybridized with a probe to detect *pPH1243*. Note that the relaxed topoisomers migrated more rapidly than the supercoiled ones, as indicated by the arrow except for hyper-negatively supercoiled topoisomers [--] that also migrate rapidly. (B) Cells from wild-type strain (RFM443) and from  $\Delta topA$  *rnhA::cam*

*gyrB(Ts)* strain (VU129) and its *holC2::aph* (VU600), *oriC15::aph* (VU605) and *dnaT18::aph* (VU148) derivatives were grown in LB (+ or - IPTG, 1mM) at 37° to an OD<sub>600</sub> of 0.3. Rifampicin (300 µg/ml) was added to prevent the initiation of new rounds of replication and the cells were incubated for an additional two hours, to allow the ongoing replication rounds to terminate (run-out experiments, (38)) as described in Material and methods. Cells were washed, fixed and stained with SYTO 16 (Molecular Probes) as described in Material and methods. Flow cytometry was performed on a Becton Dickinson FACScalibur. The horizontal axis represents the SYTO 16 fluorescence intensity (DNA content) and the vertical axis represents the number of events (cells). The arrows point to anucleate cells.

### **Characterization of suppressors affecting genes involved nucleotide metabolism.**

Fig. 6A shows that mutations in genes affecting nucleotide metabolism were generally very good in suppressing the chromosome segregation defect of the *ΔtopA rnhA::cam* strain, VU129. Our results of supercoiling analysis with pPH1243 also showed that the ability of these mutations to correct the segregation defect correlated with their ability to restore supercoiling (not shown). One of the best suppressors was found to be *dcd49::aph*, as shown here by the fact that this mutation strongly reduced the number of anucleate cells produced by VU129 strain (anucleate cells indicated by an arrow, compare VU129 and VU615). The *dcd* gene codes for dCTP deaminase, an enzyme that catalyzes dCTP deamination to dUTP in the major pathway for dTTP biosynthesis. In fact, this pathway is responsible for 75% of the dTTP synthesis in *E. coli* (49). Therefore, inactivating this gene should reproduce the previously described thymine limitation condition, in which the reduction in the pool size of thymine metabolites caused a reduction in the rate of replication elongation (50). The suppressor mutation *cmk70::aph* (VU616) affects the enzyme cytidine monophosphate kinase that rephosphorylates CMP and dCMP, which are produced by the turnover of nucleic acids. Inactivation of the *cmk* gene was previously shown to cause a reduction by 30 and 70% of the dTTP and dCTP pools respectively which, in turn, reduced the replication elongation rate by half (51). Thus, one possible mechanism by which the suppressor mutations affecting nucleotide metabolism corrected the defects in gyrase supercoiling activity and chromosome segregation of VU129, is by reducing the replication elongation rate in this strain. By doing



so, replication from R-loop would be reduced. This is supported by the results presented in Fig. 6B where it is shown that both the *dcd49::aph* and *upp31::aph* mutations reduced the ability of a *dnaA(Ts) rnhA::cam* strain to grow at the non-permissive temperature (42°C). This strain can normally grow at this temperature because it can replicate its chromosome via cSDR owing to the absence of RNase HI (20). Furthermore, also supporting the correlation between the ability to reduce replication from R-loops and to suppress the chromosome segregation defect, is the observation that the *dcd49::aph* mutation was better than the *upp31::aph* mutation both to inhibit the growth of the *dnaA(Ts) rnhA::cam* strain at 42°C (Fig. 6B) and to correct the chromosome segregation defect of VU129 (Fig. 6A).

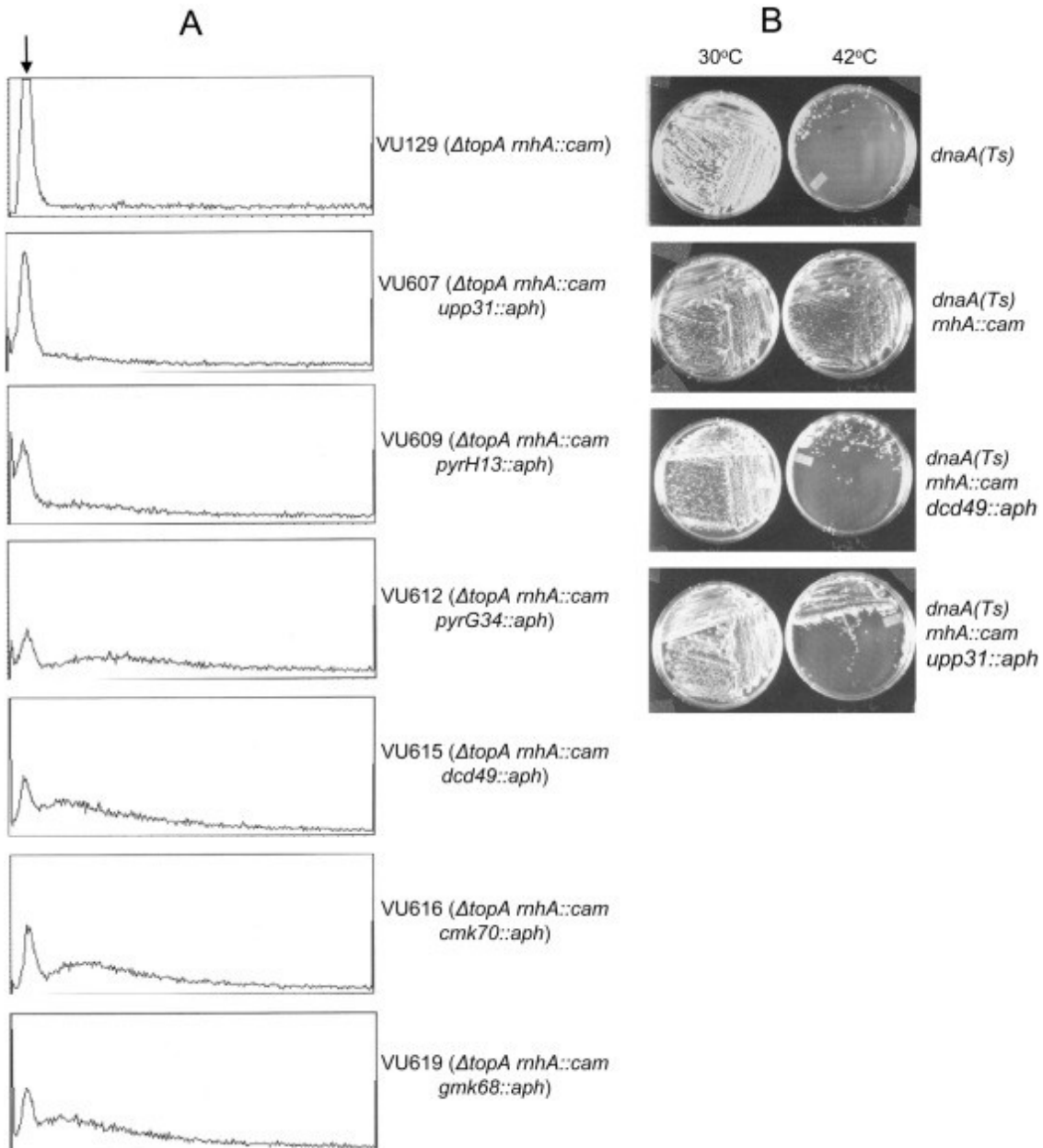


Figure 6. Effects of mutations in genes involved in nucleotide metabolism on chromosome segregation in a *topA rnhA gyrB(Ts)* strain and on cSDR in an *rnhA* null strain.

In (A) cells from  $\Delta topA$  *rnhA::cam* *gyrB(Ts)* strain (VU129) and its *upp31::aph* (VU607), *pyrH13::aph* (VU609), *pyrG34::aph* (VU612), *dcd49::aph* (VU615), *cmk70::aph* (VU616) and *gmk68::aph* (VU619) derivatives were grown for flow cytometry analysis as described in the legend to **Fig. 5**. The arrows point to anucleate cells. In (B) Cells of *dnaA46(Ts)* (MD48), *dnaA46(Ts) rnhA::cam* (JE35), *dnaA46(Ts) dcd49::aph* (VU325) and *dnaA46(Ts) upp31::aph*

(VU250) were streaked on LB plates. The plates were incubated for 24 h at the indicated temperature.

Also in agreement with the interplay between gyrase inhibition, chromosome segregation defects and replication from R-loops in the *topA rnhA* null mutant, is the isolation of several independent suppressors affecting *rne* (Table 2), the gene encoding RNase E which is the main endoribonuclease in *E. coli*. Indeed, we have shown that one of these suppressors (*rne59::aph*) was able to significantly correct both the growth and chromosome segregation defects of a *topA topB* null mutant (20), problems that were recently shown to be related to cSDR (18). Here we show that the *rne59::aph* mutation restored the supercoiling level in VU129 (Fig.S3A) and corrected the chromosome segregation defect in this strain (Fig. S3B). Moreover, Fig. S3C shows that the *rne59::aph* mutation reproducibly reduced cSDR in the *rnhA::cam* strain (right panels compare *rnhA::cam* strain (76.6%) and *rnhA::cam rne59::aph* strain (two independent experiments, 47.3 and 55.2% respectively)). This result is consistent with the observation that the *rne59::aph* mutation reduced the ability of a *dnaA(Ts) rnhA::cam* strain to grow at 42°C (20).

### **Characterization of suppressors affecting genes involved fimbriae synthesis.**

Suppressors inactivating genes involved in fimbriae synthesis (Table 2) were also characterized in the present work. Fimbriae are surface-localized adhesins allowing bacteria to adhere to host tissues structures during pathogenesis (52). They are also involved in the transition from a free planktonic lifestyle to a surface lifestyle (biofilm). A biofilm is a structured community of bacterial cells inside a polymeric matrix synthesized by these cells, and that allow bacteria to adhere to inert or living surfaces (53). Thus, the putative link between genes involved in fimbriae synthesis and chromosome segregation or gyrase supercoiling activity is interesting but not obvious.

We have investigated the effects of the *fimD*, *ygiL*, *ybgP* and *qseC* insertion mutations on supercoiling and chromosome segregation in the  $\Delta$ *topA rnhA::cam* strain. The *fimD* gene, a member of the *fimAICDFGH* operon, codes for an outer membrane protein named the usher that is required for type 1 pili (or fimbriae) biogenesis (54). Interestingly, the expression of this operon is regulated by DNA supercoiling (55). YgiL, is a fimbrial-like adhesin protein,

and *ygiL* is encoded by the first gene in the cryptic fimbriae-like operon *ygiLyqiGHI* that is usually not expressed in *E. coli* K12 cells (56). This repression has been shown to be due to the silencing of the promoter by H-NS, the universal silencer of stress-response genes. LeuO plays an anti-silencing role for *ygiL* expression and its overproduction was shown to allow the expression of *ygiL* in log phase cells (57). In agreement with this finding, our microarray results indicated that the expression of both *leuO* and *ygiL* was increased 3 to 4 times in a *topA rnhA* null mutant as compared to a wild-type strain (not shown). Thus, *ygiL* is most likely expressed in our *ΔtopA rnhA::cam* strain, VU129. YbgP, like FimD, is a member of the Fimbrial Usher Porin (FUP) family and is part of the fimbrial-like *ybgOPQD* operon (56). This operon was found to be weakly expressed in *E. coli* K12 cells, unless the *hns* gene was deleted (56). Our microarray results did not reveal an increase in *ybgOPQD* expression in a *topA rnhA* null mutant. However, we presume that its expression level was sufficiently high to explain the positive effect that *ybgP* inactivation had on the growth of our *ΔtopA rnhA::cam* strain, VU129. *qseC* was also included in our study of genes involved in fimbriae synthesis, because its inactivation has been shown to result in downregulation of type 1 pili (58). This gene codes for QseC, the histidine kinase of the two-component system QseBC that responds to quorum-sensing and that is involved in pathogenesis (58, 59). Quorum-sensing allows bacteria to communicate between themselves in a population, via self-generated autoinducers that trigger the activation or repression of target genes. QseBC and quorum-sensing are involved in biofilm formation.

Fig. 7A shows that the four suppressor mutations restored supercoiling activity in the *ΔtopA rnhA::cam* strain. Indeed, a high amount of hypernegatively supercoiled pPH1243 DNA was produced in the *fimD22::aph*, *ygiL65::aph*, *ybgP66::aph* and *qseC54::aph* derivatives of VU129 (lanes 3, 4, 5 and 8, see [--]), but not in VU129 alone (lanes 2, 7 and 10). Lanes 1, 6 and 9 represent the positive control for hypernegatively supercoiled pPH1243 DNA, extracted from the *ΔtopA* strain, RFM475. Fig. 7B shows that the chromosome segregation defects of VU129 were partially suppressed by the four mutations. Indeed, as compared to the VU129 strain alone, the presence of these mutations reduced both the number of anucleate cells and the proportion of DNA labeling detected on the right side of the histogram (compare VU129 with the isogenic strains VU620 (*fimD22::aph*), VU625 (*ygiL65::aph*), VU628 (*ybgP66::aph*) and VU623 (*qseC54::aph*)). Thus, mutations affecting

fimbriae synthesis correct the strong defects in gyrase supercoiling activity and chromosome segregation of a  $\Delta topA rnhA::cam$  strain.

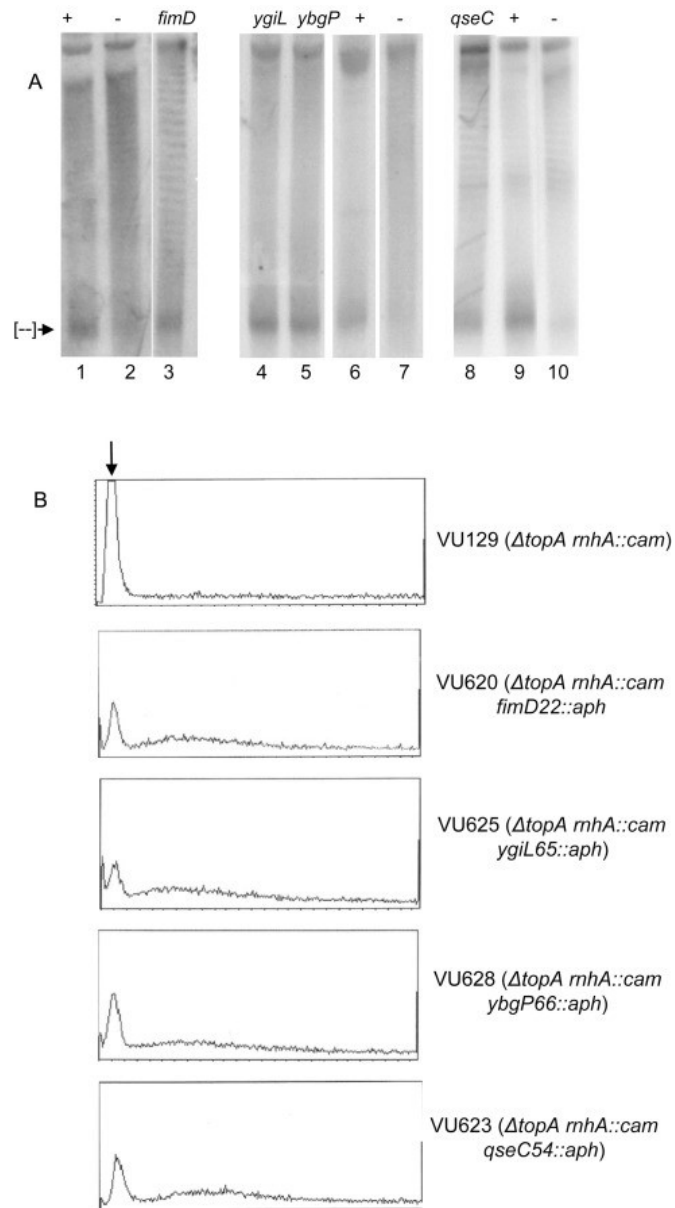


Figure 7. Effects of mutations in genes involved in fimbriae synthesis on supercoiling and chromosome segregation in a  $topA rnhA gyrB(Ts)$  strain.

Cells carrying *pPH1243* from  $\Delta topA gyrB(Ts)$  strain (RFM475) and from  $\Delta topA rnhA::cam gyrB(Ts)$  strain (VU129) and its *fimD22::aph* (VU620), *ygiL65::aph* (VU625), *ybgP66::aph* (VU628) and *qseC54::aph* (VU623) derivatives were grown for supercoiling (A) and flow cytometry analysis (B) as described in the legend to **Fig. 5**, except that no DNA samples were

extracted from cells grown at 37°C. + and – respectively indicate DNA from RFM475 and VU129 strains.

Our results indicated that the suppressor mutations in genes involved in fimbriae synthesis had similar effects on the growth, supercoiling and chromosome segregation in VU129 strain, as compared to the suppressor mutations affecting replication from R-loops. Because of that, we tested the effects of the fimbriae gene mutations on cSDR. Moreover, since it was difficult to explain how such mutations could have corrected the phenotypes of VU129, we considered the possibility that at least some of them inactivated sites of cSDR initiation. Fig. 8A shows that the *fimD22::aph* mutation reduced the level of cSDR in the *rnhA::cam* strain (right panels, compare *rnhA::cam* (69.4%) and *rnhA::cam fimD22::aph* (51.1%)). In the case of the other mutations, none of them reduced the level of cSDR in the *rnhA::cam* strain (compare the right panels labeled *rnhA::cam* (69.4%), *rnhA::cam ygiL65::aph* (70.7%), *rnhA::cam ybgP66::aph* (70.4%) and *rnhA::cam qseC54::aph* (69.6%)). Fig. 8B demonstrates that these results were highly reproducible (right panels, compare *rnhA::cam ygiL65::aph* (two independent experiments, 75.3 and 70.7%) and *rnhA::cam fimD22::aph* (two independent experiments, 52.3 and 50.3%)). As one of the origins of cSDR replication was recently localized in a region corresponding to the *fimAICDFGH* operon (4.54 Mbp; (17, 55)), we believe that the *fimD22::aph* mutation reduced cSDR replication by inactivating this origin. How the other suppressor mutations in this category corrected both the supercoiling and chromosome segregation defects is unknown, but the possibility that at least some of them like *ygiL* are not expressed in the presence of *topA*, may explain why their inactivation had no effects on cSDR in the *rnhA::cam* strain (see Discussion).

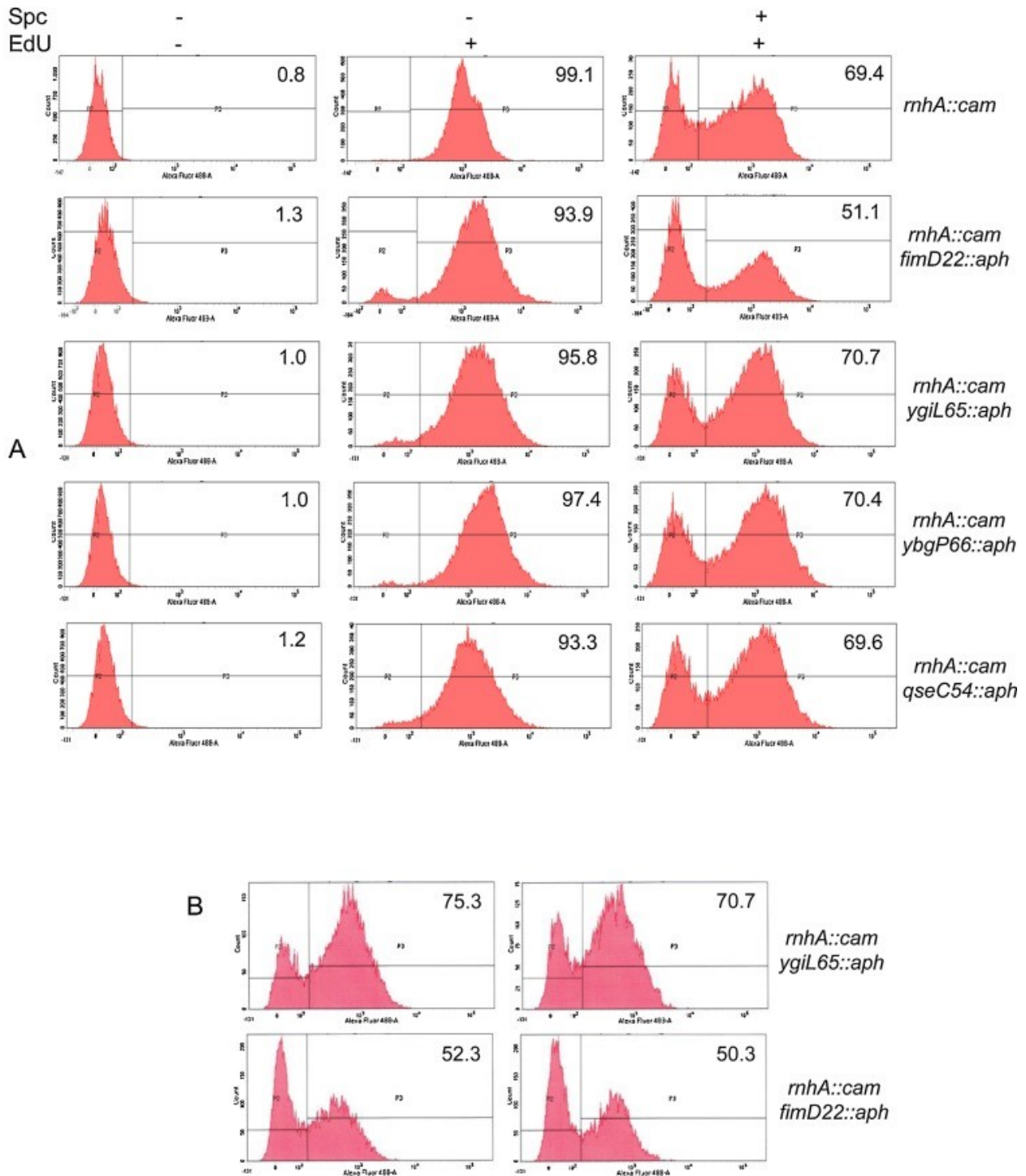


Figure 8. Effects of mutations in genes involved in fimbriae synthesis on cSDR in an *rnhA* null mutant.

In (A) Cells from *rnhA::cam* (VU19) strain and its *qseC54::aph* (AB001), *ygiL65::aph* (AB002), *ybgP66::aph* (AB003) and *fimD22::aph* (AB004) derivatives were grown and tested

for cSDR as described in the legend to Fig. 4. In (B) the results of two additional independent experiments are shown for AB002 (*rnhA::cam ygiL65::aph*) and AB004 (*rnhA::cam fimD22::aph*) strains.

### **cSDR activity in a topA rnhA null strain.**

We performed an experiment to directly demonstrate the occurrence of cSDR activity in a  $\Delta topA rnhA::cam$  strain. Fig. 9 shows that a large proportion of cells untreated with spectinomycin were not actively replicating their DNA in the case of the  $\Delta topA rnhA$  strain not overproducing topo III (middle panels (-spc and +EdU), -IPTG, 37 and 30°C, P2 zone). Indeed, over 30% of these cells were inactive in replication. A large proportion of them are most likely anucleate cells and cells with low DNA content, and overproducing topo III reduced their occurrence (middle panels (-spc and +EdU), +IPTG, 37 and 30°C, P2 zone) as previously shown (38). Thus, by taking into account the presence of non-viable cells, the proportions of cells undergoing cSDR for the  $\Delta topA rnhA$  strain not overproducing topo III, were 46.8 and 40.5% respectively at 37 and 30°C (right panels (+spc and +EdU), -IPTG, 37 and 30°C, numbers in red in the P2 zone), whereas for the  $\Delta topA rnhA$  strain overproducing topo III these percentages were respectively 32.7 and 48.5 (right panels (+spc and +EdU), +IPTG, 37 and 30°C, numbers in red in the P2 zone). We believe that these numbers are significant considering the fact that the supercoiling activity of gyrase was strongly inhibited in the  $\Delta topA rnhA$  strain, whether or not topo III was overproduced, and therefore that the global supercoiling level was clearly not optimal for R-loop formation. Indeed, the fact that the strong inhibition of the supercoiling activity of gyrase is not seen in a strain lacking only RNase HI (data not shown) could explain, at least in part, why the level of cSDR is higher in single *rnha* null mutants as compared to double *topA rnhA* null mutants.



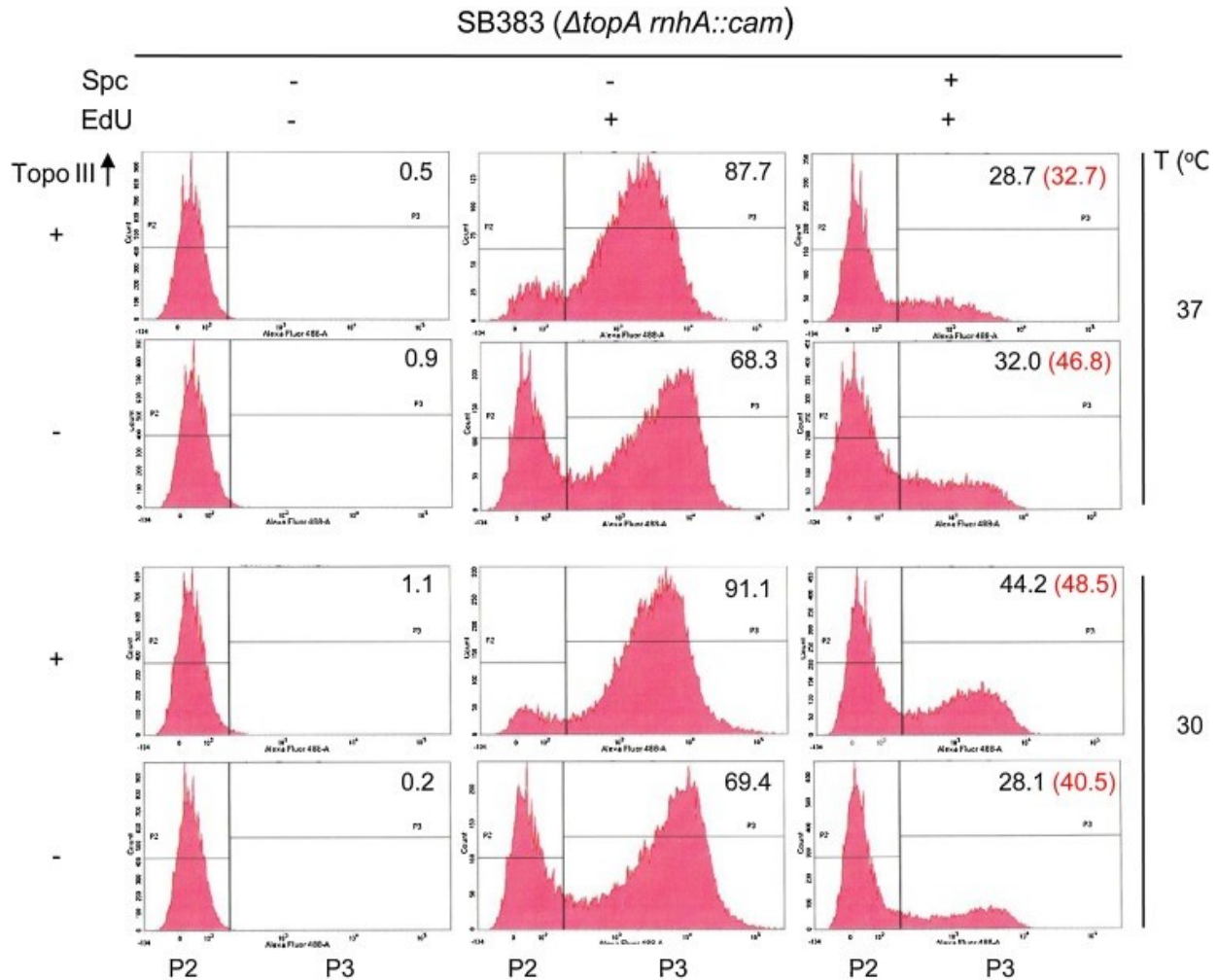


Figure 9. cSDR in *topA rnhA gyrB(Ts)* cells

*ΔtopA rnhA::cam gyrB(Ts)* (VU129) cells were grown in LB (+ or - IPTG, 1mM) at 37 or 30°C and tested for cSDR as described in the legend to Fig. 4. Numbers in red give the percentage of viable cells undergoing cSDR as they take into account the proportion of cells that are viable in the population (determined in the experiment + EdU -Spc).

Overall, our data also shows that overproducing topo III did not have a significant effect on the level of cSDR in the *ΔtopA rnhA* strain. This is in agreement with our recent finding that cSDR was present in *topA* null but not in *topB* null mutants (18). Furthermore, we have also shown that overproducing topo III did not alter the low *ori/ter* ratio in a *topA* null mutant ((20) and data not shown). Cells undergoing cSDR have a low *ori/ter* ratio (20). Lastly, according to the results presented in this paper, decreasing the level of cSDR by

overproducing topo III would be expected to restore the supercoiling activity of gyrase, which is clearly not the case (37).

### **The complementation of the growth defect of *topA rnhA* null mutants by overproducing topo III.**

We performed additional experiments to better understand the mechanism(s) by which topo III overproduction complemented the growth defect of our *topA rnhA* null mutants. We have previously shown that deleting the *recQ* gene could complement the growth defect of our *topA* null mutant and that topo III overproduction was epistatic to *recQ* deletion in complementing the growth defect of this *topA* mutant (20). This result suggested that in the *topA* null mutant, RecQ helicase generated toxic DNA structures that could only be resolved by a type IA topo. Here we show that deleting *recQ* had no effect on the growth of our *topA rnhA* null mutant (Fig. S4A, 37°C, -IPTG, compare  $\Delta topA rnhA::cam$  and  $\Delta topA rnhA::cam \Delta recQ767::kan$ ) and that topo III overproduction was able to complement the growth defect of the double mutant whether or not *recQ* was present (Fig. S4A, 37°C, +IPTG, compare  $\Delta topA rnhA::cam$  and  $\Delta topA rnhA::cam \Delta recQ767::kan$ ). Thus, in the absence of RNase HI, topo III overproduction complements a function of *topA* that is unrelated to RecQ.

We also found that topo III overproduction could not complement the growth defect of the *topA rnhA* null mutant at the low temperature of 24°C (Fig. S4A, 24°C,  $\Delta topA rnhA::cam$  and  $\Delta topA rnhA::cam \Delta recQ767::kan$ , compare + and - IPTG), even in the presence of the *gyrB*<sup>+</sup> allele (Fig. S4B, 24°C,  $\Delta topA rnhA::cam gyrB^+$ , compare + and - IPTG). We have previously shown that hyper-negatively supercoiled DNA in *topA* mutants accumulates at low temperatures because of its stabilization that is related, at least in part, to the inability of topo IV to relax it at these temperatures (19, 37). In the absence of RNase HI, such conditions should promote the extensive accumulation of stable R-loops, independent of the nucleotide sequence (19, 29). Furthermore, this result suggests that topo III overproduction is unable to complement functions of *topA* that are related to the regulation of DNA supercoiling.

## Discussion

Because of the important effects that R-loops can have on the maintenance of genome stability in organisms from bacteria to humans, it was of interest to investigate the mechanism(s) responsible for the severe phenotypes of *E. coli* cells lacking two major regulators of R-loop formation, namely topo I and RNase HI. Interestingly, topo I (both the type 1A and B) and RNase H also play a major role in the regulation of R-loop formation in eukaryotic cells (60-62).

Here our data suggest that unregulated replication from R-loops is a major pathway by which such structures could affect the stability of the genome in cell lacking topo I and RNase HI. Indeed, suppressors, from various categories, of the growth defect of our *topA rnhA* null mutant, namely *dnaT18::aph*, *holC2::aph*, *dcd49::aph*, *upp31::aph*, *rne59::aph* and *fimD22::aph* that corrected the chromosome segregation and supercoiling defects, were also found to reduce replication from R-loops. Interestingly, evidence for R-loop-dependent replication initiating DNA breakage and genome instability in non-growing *E. coli* cells has been recently presented (24). Furthermore, replication from R-loops in eukaryotes has just been demonstrated (63) and, based on experimental evidence, it has been suggested that R-loop formation at CpG islands could contribute to the phenotype of DNA replication abnormalities and loss of genome integrity found in cancer cells (64).

How the supercoiling defect related to the inhibition of the ATP-dependent activity of DNA gyrase was linked to replication from R-loops is currently unknown. One possibility is that such replication altered the overall gene expression profile in the cell in such a way that gyrase supercoiling activity was inhibited (e.g. changes in the ATP/ADP ratio, increase expression of a gyrase inhibitor, etc.). Indeed, recent high-resolution marker frequency analyses by deep-sequencing to show replication profiles, have revealed important differences between cells initiating replication from *oriC* and those initiating from R-loops (16, 17). Thus, the overall gene expression profile could be altered due to gene dosage effects. More work need to be done to understand the interplay between replication from R-loops and the supercoiling activity of DNA gyrase.

The data presented in this work also support our previous conclusion that the inhibition of gyrase was largely responsible for the chromosome segregation defect of our *topA rnhA*

null strain (38). Indeed, this problem was shown to be corrected by substituting the *gyrB*(Ts) allele of this strain for a *gyrB*<sup>+</sup> one. As stated in the results section, the *gyrB*(Ts) allele presents in our strains carries the *gyrB221* mutation conferring resistance to coumermycin, an antibiotic that inhibits the ATPase activity of GyrB. This mutation by itself was shown to reduce the ATPase activity of GyrB by 48% relative to a wild-type GyrB protein (65). Therefore, the mutated gyrase present in our *topA rnhA* null strains would be much more affected than a wild-type enzyme by a mechanism targeting the ATP-dependent supercoiling activity of gyrase, as suggested here from the results of *in vitro* and *in vivo* supercoiling measurement. This would explain, at least in part, the severe phenotypes of our *topA rnhA* null strains.

Our result showing the partial inhibition of cSDR following the introduction of the *fimD22::aph* mutation in the *rnhA::cam* strain, may have provided genetic evidence for the presence of a cSDR initiation site in this region, a site that was recently mapped following high-resolution marker frequency analyses by deep-sequencing in cells lacking RNase HI (16, 17). The expression of the *fimAICDFGH* operon is regulated by two tyrosine integrases (FimB and FimE) that catalyze the inversion of a DNA segment (the *fim* switch) carrying the promoter of the operon (55). Therefore, type 1 fimbriae synthesis is subject to phase variation, with bacterial populations containing fimbriate (phase-ON) and afimbriate (phase-OFF) cells. Furthermore, these two cell types are interchangeable. Interestingly, topo I activity in the immediate vicinity of the *fim* switch is required for the inversion process and DNA gyrase activity also influence this process. In fact, inhibiting the supercoiling activity of DNA gyrase with novobiocin has been shown to strongly favour the ON phase (55, 66). Thus, the sites of cSDR initiation might be strongly influenced both qualitatively and quantitatively by DNA topology and, therefore, sites that are active in *topA* and *topA rnhA* null cells might not be active in *rnhA* null cells. Our results showing that the *ygiL65::aph* mutation was as efficient as the *fimD22::aph* mutation in correcting both the supercoiling and chromosome segregation defects of the *topA rnhA* null mutant but, unlike this *fimD* mutation, had no effects on cSDR in an *rnhA* null strain, may be explained in this context. Indeed, *ygiL* is part of a cryptic operon that is normally not expressed in wild-type cells. However, we have found that this operon is expressed in our *topA* and *topA rnhA* null mutants likely because LeuO, a positive regulator of this cryptic operon (56), was shown to be overproduced in these mutants (data not shown).

Thus, *ygiL* may be active as an origin of cSDR in our *topA rnhA* null cells but not in single *rnhA* null mutants. This could also be the case for other cSDR initiation sites that may correspond to some of the suppressor mutants isolated in our *topA rnhA* null mutants, especially mutants from genes that have no obvious link with replication from R-loops.

When our *topA rnhA* null mutant was exposed to the low temperature of 24°C, topo III overproduction was unable to complement its growth defect. Such low temperatures were previously shown to be very restrictive for the growth of our *topA* null mutants because they lead to the accumulation and stabilization of hyper-negatively supercoiled DNA, owing to the inability of topo IV to relax it (19, 37). Presumably, under these conditions, stable R-loops may accumulate at many different loci and, as a result, growth and most of the cellular activities, including replication, could be rapidly inhibited. In this context, our result suggest that topo III overproduction is unable to complement functions of *topA* that are linked to supercoiling and R-loop regulation. This is in agreement with our observation that topo III overproduction, unlike RNase HI overproduction, was unable to prevent the supercoiling-dependent transient growth arrest of a *topA gyrB(Ts)* strain, following a temperature downshift ((19) and data not shown). Recent structural studies of full-length *E. coli* topo I in complex with ssDNA, nicely explain why topo I but not topo III can efficiently relax hyper-negatively supercoiled DNA (67). The C-terminal domains of topo I bind ssDNA to recognize the presence of negative supercoils in duplex DNA and two flexible linkers within these domains may contribute to the movement of the ssDNA that is required for the rapid removal of transcription-induced negative supercoils (67). Interestingly, the inability of topo III overproduction to complement the growth defect of cells lacking both topo I and RNase HI has also been recently reported by another group (68).

Based on genetic evidence two functions of topo I that are unrelated to supercoiling regulation have been proposed. In the first one, topo I acts with RecQ to resolve recombination intermediates to allow chromosome segregation (20). Our finding that deleting *recQ* had no effects on the growth of our *topA rnhA* null mutants, shows that topo III overproduction did not rescue the growth defect of these mutants by complementing the function of topo I performed with RecQ helicase. Another function of topo I in chromosome segregation but independent of RecQ was revealed following the study of double *topA topB* null mutants (69). Moreover, we have recently presented experimental evidence showing that

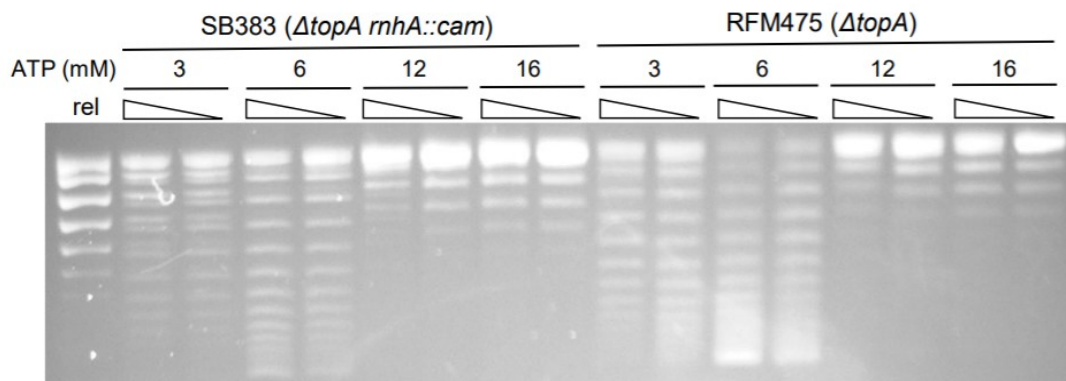
this function was especially required when gyrase supercoiling activity was defective, or when cells were undergoing cSDR (18, 20). We have proposed that this function might be related to replication termination, when convergent replication forks merge. Such a function would be especially required when fork merging is strongly inhibited due to the accumulation of positive supercoiling that are not efficiently removed by a defective gyrase. When cSDR is occurring, forks merging is expected to occur at different sites on the chromosome, at sites other than the normal termination region (*ter*). Over-replication has been shown to occur when replication forks collide (23, 70, 71). Because of that, fork merging in cells undergoing cSDR can lead to pathological replication (23). We have proposed that by unlinking the DNA strands before fork merging, type 1a topoisomerase could prevent over-replication (18). Thus, in our *topA rnhA* null mutants, overproduction of topo III could complement a function of topo I in replication termination that is especially required in this strain, due to defective gyrase activity and cSDR. More work is definitely required to better understand the role of type 1A topoisomerase in replication.

Another consequence of cSDR that could contribute to the sickness of our *topA rnhA* null mutants, is replication-transcription conflicts due to head-on collision between replication and transcription, as recently shown in *rnhA* null cells (17). This problem was proposed to be mostly caused by the presence of the cSDR origin located in the *fimAICDFGH* operon, because this origin is in close proximity to heavily transcribed *rrn* operons on the chromosome. Despite the fact that the *dnaT18::aph* mutation was much better than the *fimD22::aph* mutation to reduce cSDR in an *rnhA* null mutant (this work and ref. (18)), both mutations were equally efficient in correcting the supercoiling and chromosome segregation defects of our *topA rnhA* null mutant. This may suggest that it is cSDR from the origin located in the *fimAICDFGH* operon that was mostly problematic in our *topA rnhA* null mutant, possibly because of replication-transcription-conflicts.

In conclusion, the work presented here indicates that *E. coli* cells lacking two major regulators of R-loop formation, namely topo I and RNase HI, suffer mostly from the consequences of replication initiated from R-loops. This suggests that replication from R-loops is a major pathway by which R-loops could threaten genome stability. Our work also show that studying cells lacking both topo I and RNase HI enzymes may lead to the discovery

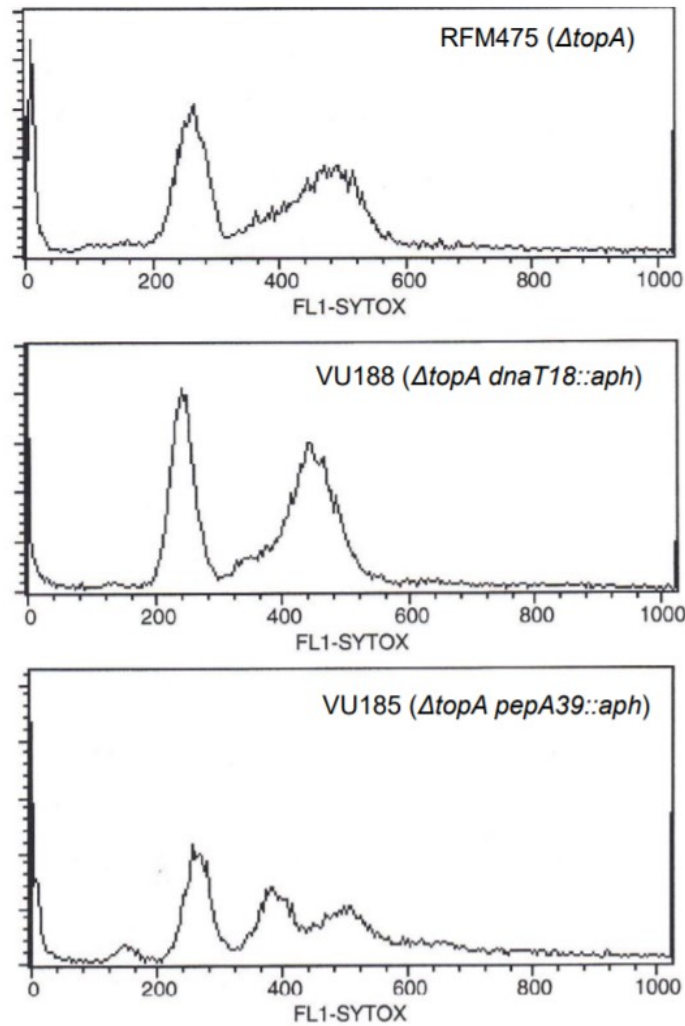
of *trans* and *cis*-acting elements involved in replication from R-loops and may also contribute to our understanding of the cellular function of type 1A topos.

## Supplementary figures

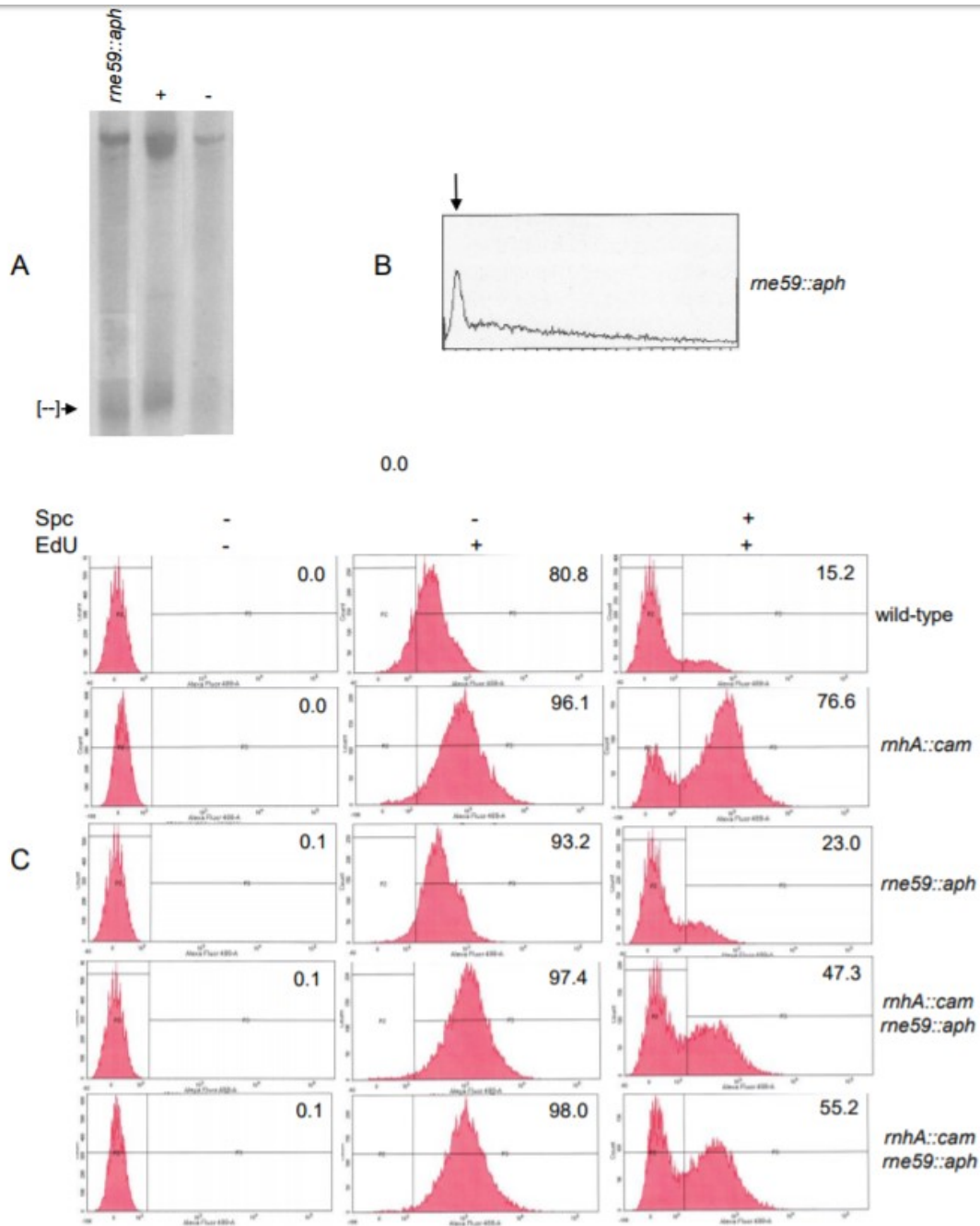


**Fig. S1. Effects of the ATP concentration on supercoiling activity in crude cell extracts.** Crude cell extracts (12  $\mu$ g of proteins) from isogenic SB383 ( $\Delta topA rnhA::cam gyrB(Ts)$ ) and RFM475 ( $\Delta topA gyrB(Ts)$ ) strains were prepared and used for supercoiling assays in the presence of various concentrations of ATP.



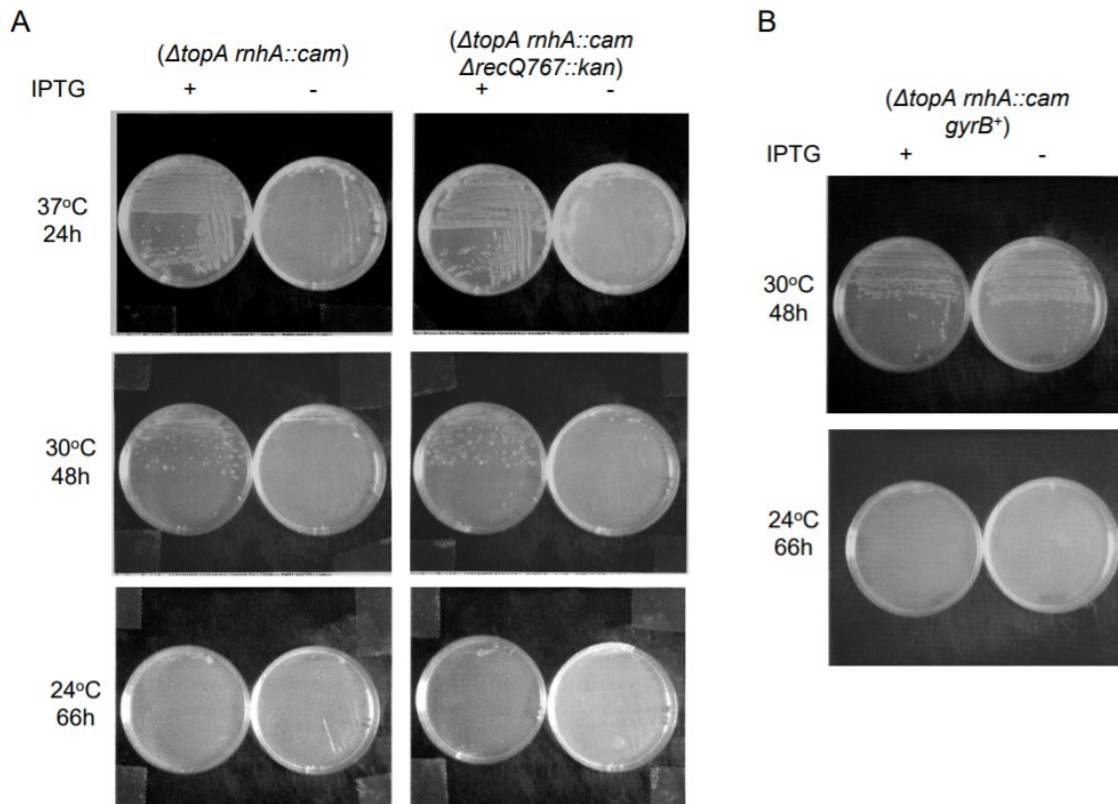


**Fig. S2. Flow cytometry analysis to study the effect of *dnaT18::aph* and *pepA39::aph* mutations on replication initiation in a *ΔtopA gyrB(Ts)* strain.** Cells from *ΔtopA gyrB(Ts)* strain (RFM475) and its *dnaT18::aph* (VU188) and *pepA39::aph* (VU185) derivatives were grown in LB at 37° to an OD<sub>600</sub> of 0.3. Rifampicin (300 μg/ml) was added to prevent the initiation of new rounds of replication and the cells were incubated for an additional two hours, to allow the ongoing replication rounds to terminate (run-out experiments). We have shown that the *pepA39::aph* mutation affects the downstream gene, *holC* (footnote b in Table 2).



**Fig. S3. Effects of the *rne59::aph* mutation on supercoiling and chromosome segregation in a *topA rnhA gyrB(Ts)* strain and on cSDR in an *rnhA* null mutant.** Cells carrying pPH1243 from *ΔtopA gyrB(Ts)* strain (RFM475) and from *ΔtopA rnhA:cam gyrB(Ts)* strain (VU129) and its *rne59::aph* (VU640) derivative were grown for supercoiling (A) and flow cytometry analysis (B) as described in the legend to **Fig. 5**, except that no DNA samples were extracted from cells grown at 37°C. + and – respectively indicate DNA from RFM475 and

VU129 strains. In (C) Cells from wild-type strain (RFM443), *rne59::aph* strain (MM120), *rnhA::cam* strain (VU19) and its *rnhA::cam rne59::aph* derivative (MM122) were grown and tested for cSDR as described in the legend to **Fig. 4**.



**Fig. S4. The ability of topo III overproduction to complement the growth defect of a *topA rnhA gyrB(Ts)* strain and its derivatives on LB plates at various temperatures.** Cells of *ΔtopA rnhA::cam gyrB(Ts)* strain (VU129) and its *ΔrecQ767::kan* (MM101) and *gyrB<sup>+</sup>* (NF98) derivatives were streaked on LB plates with or without IPTG as indicated. The plates were incubated at the indicated temperature for the indicated period of time.

## **Acknowledgments**

We thank Serge Sénéchal for assistance with flow cytometry and Patrick Hallenbeck for English editing. This work was supported by a Discovery Grant from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) to MD. VU was supported by a FESP student award. AB and MM were supported by an Undergraduate Student Research Awards from the NSERC.

## References

1. Vassilyev DG, Vassilyeva MN, Perederina A, Tahirov TH, Artsimovitch I. Structural basis for transcription elongation by bacterial RNA polymerase. *Nature*. 2007;448(7150):157-62.
2. Liu LF, Wang JC. Supercoiling of the DNA template during transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1987;84(20):7024-7.
3. Masse E, Drolet M. Escherichia coli DNA topoisomerase I inhibits R-loop formation by relaxing transcription-induced negative supercoiling. *J Biol Chem*. 1999;274(23):16659-64.
4. Roy D, Yu K, Lieber MR. Mechanism of R-loop formation at immunoglobulin class switch sequences. *Mol Cell Biol*. 2008;28(1):50-60.
5. Drolet M, Bi X, Liu LF. Hypernegative supercoiling of the DNA template during transcription elongation in vitro. *J Biol Chem*. 1994;269(3):2068-74.
6. Drolet M, Phoenix P, Menzel R, Masse E, Liu LF, Crouch RJ. Overexpression of RNase H partially complements the growth defect of an Escherichia coli delta topA mutant: R-loop formation is a major problem in the absence of DNA topoisomerase I. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995;92(8):3526-30.
7. Skourti-Stathaki K, Proudfoot NJ. A double-edged sword: R loops as threats to genome integrity and powerful regulators of gene expression. *Genes Dev*. 2014;28(13):1384-96.
8. Groh M, Gromak N. Out of balance: R-loops in human disease. *PLoS Genet*. 2014;10(9):e1004630.
9. Sollier J, Cimprich KA. Breaking bad: R-loops and genome integrity. *Trends Cell Biol*. 2015;25(9):514-22.
10. Aguilera A, Garcia-Muse T. R loops: from transcription byproducts to threats to genome stability. *Mol Cell*. 2012;46(2):115-24.
11. Santos-Pereira JM, Aguilera A. R loops: new modulators of genome dynamics and function. *Nat Rev Genet*. 2015;16(10):583-97.
12. Itoh T, Tomizawa J. Formation of an RNA primer for initiation of replication of ColE1 DNA by ribonuclease H. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1980;77(5):2450-4.
13. Ogawa T, Pickett GG, Kogoma T, Kornberg A. RNase H confers specificity in the dnaA-dependent initiation of replication at the unique origin of the Escherichia coli chromosome in vivo and in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1984;81(4):1040-4.
14. Kogoma T. A novel Escherichia coli mutant capable of DNA replication in the absence of protein synthesis. *J Mol Biol*. 1978;121(1):55-69.
15. Kogoma T. Stable DNA replication: interplay between DNA replication, homologous recombination, and transcription. *Microbiol Mol Biol Rev*. 1997;61(2):212-38.
16. Maduike NZ, Tehrani AK, Wang JD, Kreuzer KN. Replication of the Escherichia coli chromosome in RNase HI-deficient cells: multiple initiation regions and fork dynamics. *Mol Microbiol*. 2014;91(1):39-56.
17. Dimude JU, Stockum A, Midgley-Smith SL, Upton AL, Foster HA, Khan A, et al. The Consequences of Replicating in the Wrong Orientation: Bacterial Chromosome Duplication without an Active Replication Origin. *MBio*. 2015;6(6).
18. Martel M, Balleydier A, Sauriol A, Drolet M. Constitutive stable DNA replication in Escherichia coli cells lacking type 1A topoisomerase activity. *DNA Repair*. 2015;35:37-47.

19. Baaklini I, Usongo V, Nolent F, Sanscartier P, Hraiky C, Drlica K, et al. Hypernegative supercoiling inhibits growth by causing RNA degradation. *J Bacteriol.* 2008;190(22):7346-56.
20. Usongo V, Drolet M. Roles of type 1A topoisomerases in genome maintenance in *Escherichia coli*. *PLoS Genet.* 2014;10(8):e1004543.
21. Vincent SD, Mahdi AA, Lloyd RG. The RecG branch migration protein of *Escherichia coli* dissociates R-loops. *J Mol Biol.* 1996;264(4):713-21.
22. Fukuoh A, Iwasaki H, Ishioka K, Shinagawa H. ATP-dependent resolution of R-loops at the ColE1 replication origin by *Escherichia coli* RecG protein, a Holliday junction-specific helicase. *EMBO J.* 1997;16(1):203-9.
23. Rudolph CJ, Upton AL, Stockum A, Nieduszynski CA, Lloyd RG. Avoiding chromosome pathology when replication forks collide. *Nature.* 2013;500(7464):608-11.
24. Wimberly H, Shee C, Thornton PC, Sivaramakrishnan P, Rosenberg SM, Hastings PJ. R-loops and nicks initiate DNA breakage and genome instability in non-growing *Escherichia coli*. *Nat Commun.* 2013;4:2115.
25. Bush NG, Evans-Roberts K, Maxwell A. DNA Topoisomerases. *Ecosal Plus.* 2015;6(2).
26. Funnell BE, Baker TA, Kornberg A. Complete enzymatic replication of plasmids containing the origin of the *Escherichia coli* chromosome. *J Biol Chem.* 1986;261(12):5616-24.
27. Holmes VF, Cozzarelli NR. Closing the ring: links between SMC proteins and chromosome partitioning, condensation, and supercoiling. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97(4):1322-4.
28. Rovinskiy N, Agbleke AA, Chesnokova O, Pang Z, Higgins NP. Rates of gyrase supercoiling and transcription elongation control supercoil density in a bacterial chromosome. *PLoS Genet.* 2012;8(8):e1002845.
29. Drolet M. Growth inhibition mediated by excess negative supercoiling: the interplay between transcription elongation, R-loop formation and DNA topology. *Mol Microbiol.* 2006;59(3):723-30.
30. Pruss GJ, Manes SH, Drlica K. *Escherichia coli* DNA topoisomerase I mutants: increased supercoiling is corrected by mutations near gyrase genes. *Cell.* 1982;31(1):35-42.
31. DiNardo S, Voelkel KA, Sternglanz R, Reynolds AE, Wright A. *Escherichia coli* DNA topoisomerase I mutants have compensatory mutations in DNA gyrase genes. *Cell.* 1982;31(1):43-51.
32. Hsieh LS, Burger RM, Drlica K. Bacterial DNA supercoiling and [ATP]/[ADP]. Changes associated with a transition to anaerobic growth. *J Mol Biol.* 1991;219(3):443-50.
33. Hsieh LS, Rouviere-Yaniv J, Drlica K. Bacterial DNA supercoiling and [ATP]/[ADP] ratio: changes associated with salt shock. *J Bacteriol.* 1991;173(12):3914-7.
34. Camacho-Carranza R, Membrillo-Hernandez J, Ramirez-Santos J, Castro-Dorantes J, Chagoya de Sanchez V, Gomez-Eichelmann MC. Topoisomerase activity during the heat shock response in *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol.* 1995;177(12):3619-22.
35. Westerhoff HV, O'Dea MH, Maxwell A, Gellert M. DNA supercoiling by DNA gyrase. A static head analysis. *Cell Biophys.* 1988;12:157-81.
36. Peter BJ, Arsuaga J, Breier AM, Khodursky AB, Brown PO, Cozzarelli NR. Genomic transcriptional response to loss of chromosomal supercoiling in *Escherichia coli*. *Genome Biol.* 2004;5(11):R87.

37. Usongo V, Nolent F, Sanscartier P, Tanguay C, Broccoli S, Baaklini I, et al. Depletion of RNase HI activity in *Escherichia coli* lacking DNA topoisomerase I leads to defects in DNA supercoiling and segregation. *Mol Microbiol.* 2008;69(4):968-81.
38. Usongo V, Tanguay C, Nolent F, Bessong JE, Drolet M. Interplay between type 1A topoisomerases and gyrase in chromosome segregation in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 2013;195(8):1758-68.
39. Masse E, Drolet M. R-loop-dependent hypernegative supercoiling in *Escherichia coli* topA mutants preferentially occurs at low temperatures and correlates with growth inhibition. *J Mol Biol.* 1999;294(2):321-32.
40. Broccoli S, Phoenix P, Drolet M. Isolation of the topB gene encoding DNA topoisomerase III as a multicopy suppressor of topA null mutations in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol.* 2000;35(1):58-68.
41. Masse E, Phoenix P, Drolet M. DNA topoisomerases regulate R-loop formation during transcription of the rrnB operon in *Escherichia coli*. *J Biol Chem.* 1997;272(19):12816-23.
42. Larsen RA, Wilson MM, Guss AM, Metcalf WW. Genetic analysis of pigment biosynthesis in *Xanthobacter autotrophicus* Py2 using a new, highly efficient transposon mutagenesis system that is functional in a wide variety of bacteria. *Arch Microbiol.* 2002;178(3):193-201.
43. Nordman J, Skovgaard O, Wright A. A novel class of mutations that affect DNA replication in *E. coli*. *Mol Microbiol.* 2007;64(1):125-38.
44. Bradshaw JS, Kuzminov A. RdgB acts to avoid chromosome fragmentation in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol.* 2003;48(6):1711-25.
45. Zechiedrich EL, Khodursky AB, Bachellier S, Schneider R, Chen D, Lilley DM, et al. Roles of topoisomerases in maintaining steady-state DNA supercoiling in *Escherichia coli*. *J Biol Chem.* 2000;275(11):8103-13.
46. Wang M, Weiss M, Simonovic M, Haertinger G, Schrimpf SP, Hengartner MO, et al. PaxDb, a database of protein abundance averages across all three domains of life. *Mol Cell Proteomics.* 2012;11(8):492-500.
47. Jain C. Identification and characterization of growth suppressors of *Escherichia coli* strains lacking phosphorolytic ribonucleases. *J Bacteriol.* 2009;191(18):5622-7.
48. Marceau AH, Bahng S, Massoni SC, George NP, Sandler SJ, Marians KJ, et al. Structure of the SSB-DNA polymerase III interface and its role in DNA replication. *EMBO J.* 2011;30(20):4236-47.
49. Weiss B, Wang L. De novo synthesis of thymidylate via deoxycytidine in dcd (dCTP deaminase) mutants of *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 1994;176(8):2194-9.
50. Zaritsky A, Woldringh CL, Einav M, Alexeeva S. Use of thymine limitation and thymine starvation to study bacterial physiology and cytology. *J Bacteriol.* 2006;188(5):1667-79.
51. Fricke J, Neuhard J, Kelln RA, Pedersen S. The cmk gene encoding cytidine monophosphate kinase is located in the rpsA operon and is required for normal replication rate in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 1995;177(3):517-23.
52. McWilliams BD, Torres AG. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* Adhesins. *Microbiol Spectr.* 2014;2(3).
53. Van Houdt R, Michiels CW. Role of bacterial cell surface structures in *Escherichia coli* biofilm formation. *Res Microbiol.* 2005;156(5-6):626-33.

54. Werneburg GT, Henderson NS, Portnoy EB, Sarowar S, Hultgren SJ, Li H, et al. The pilus usher controls protein interactions via domain masking and is functional as an oligomer. *Nat Struct Mol Biol.* 2015;22(7):540-6.
55. Dorman CJ, Corcoran CP. Bacterial DNA topology and infectious disease. *Nucleic acids research.* 2009;37(3):672-8.
56. Korea CG, Badouraly R, Prevost MC, Ghigo JM, Beloin C. *Escherichia coli* K-12 possesses multiple cryptic but functional chaperone-usher fimbriae with distinct surface specificities. *Environ Microbiol.* 2010;12(7):1957-77.
57. Shimada T, Bridier A, Briandet R, Ishihama A. Novel roles of LeuO in transcription regulation of *E. coli* genome: antagonistic interplay with the universal silencer H-NS. *Mol Microbiol.* 2011;82(2):378-97.
58. Kostakioti M, Hadjifrangiskou M, Pinkner JS, Hultgren SJ. QseC-mediated dephosphorylation of QseB is required for expression of genes associated with virulence in uropathogenic *Escherichia coli*. *Mol Microbiol.* 2009;73(6):1020-31.
59. Karavolos MH, Winzer K, Williams P, Khan CM. Pathogen espionage: multiple bacterial adrenergic sensors eavesdrop on host communication systems. *Mol Microbiol.* 2013;87(3):455-65.
60. El Hage A, French SL, Beyer AL, Tollervey D. Loss of Topoisomerase I leads to R-loop-mediated transcriptional blocks during ribosomal RNA synthesis. *Genes Dev.* 2010;24(14):1546-58.
61. Yang Y, McBride KM, Hensley S, Lu Y, Chedin F, Bedford MT. Arginine methylation facilitates the recruitment of TOP3B to chromatin to prevent R loop accumulation. *Mol Cell.* 2014;53(3):484-97.
62. Chon H, Sparks JL, Rychlik M, Nowotny M, Burgers PM, Crouch RJ, et al. RNase H2 roles in genome integrity revealed by unlinking its activities. *Nucleic acids research.* 2013;41(5):3130-43.
63. Stuckey R, Garcia-Rodriguez N, Aguilera A, Wellinger RE. Role for RNA:DNA hybrids in origin-independent replication priming in a eukaryotic system. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2015;112(18):5779-84.
64. Lombrana R, Almeida R, Alvarez A, Gomez M. R-loops and initiation of DNA replication in human cells: a missing link? *Front Genet.* 2015;6:158.
65. Contreras A, Maxwell A. gyrB mutations which confer coumarin resistance also affect DNA supercoiling and ATP hydrolysis by *Escherichia coli* DNA gyrase. *Mol Microbiol.* 1992;6(12):1617-24.
66. Dove SL, Dorman CJ. The site-specific recombination system regulating expression of the type 1 fimbrial subunit gene of *Escherichia coli* is sensitive to changes in DNA supercoiling. *Mol Microbiol.* 1994;14(5):975-88.
67. Tan K, Zhou Q, Cheng B, Zhang Z, Joachimiak A, Tse-Dinh YC. Structural basis for suppression of hypernegative DNA supercoiling by *E. coli* topoisomerase I. *Nucleic acids research.* 2015;43(22):11031-46.
68. Stockum A, Lloyd RG, Rudolph CJ. On the viability of *Escherichia coli* cells lacking DNA topoisomerase I. *BMC Microbiol.* 2012;12:26.
69. Zhu Q, Pongpech P, DiGate RJ. Type I topoisomerase activity is required for proper chromosomal segregation in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98(17):9766-71.



70. Hiasa H, Marians KJ. Tus prevents overreplication of oriC plasmid DNA. *J Biol Chem.* 1994;269(43):26959-68.
71. Wendel BM, Courcelle CT, Courcelle J. Completion of DNA replication in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014;111(46):16454-9.

