



HAL
open science

Mécanisme d'intégration du phage TLC dans le génome de *Vibrio cholerae*

Caroline Midonet

► **To cite this version:**

Caroline Midonet. Mécanisme d'intégration du phage TLC dans le génome de *Vibrio cholerae*. Biochimie, Biologie Moléculaire. Université Paris Saclay (COmUE), 2016. Français. NNT : 2016SACLS314 . tel-01430574

HAL Id: tel-01430574

<https://theses.hal.science/tel-01430574>

Submitted on 10 Jan 2017

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

2016SACLS314

THESE DE DOCTORAT
DE
L'UNIVERSITE PARIS-SACLAY
PREPAREE A
L'UNIVERSITE PARIS SUD

ECOLE DOCTORALE N° ([577](#))
Structure et Dynamique des Systèmes Vivants (SDSV)
Spécialité Science de la Vie et de la Santé

Par

M^{elle} Caroline Midonet

**Mécanisme d'intégration du phage TLC
dans le génome de *Vibrio cholerae***

Thèse présentée et soutenue à Gif-Sur-Yvette, le 11/10/2016 :

Composition du Jury :

Pr. HALLET Bernard	Université Catholique de Louvain (UCL)	Rapporteur
Dr. ROUSSEAU Philippe	CNRS - Université Toulouse III	Rapporteur
Dr. BÉTERMIER Mireille	CNRS	Examinatrice
Pr. MAZEL Didier	Institut Pasteur	Examineur
Pr. CAPY Pierre	CNRS- Université Paris-Saclay	Président
Dr. BARRE François-Xavier	CNRS	Directeur de thèse

RÉSUMÉ

La plupart des bactéries ont un unique chromosome circulaire avec une origine de réplication unique. L'ADN est une hélice double-brin qui lors de la réplication va être soumise à des contraintes topologiques. Dans le cas des chromosomes circulaires, ces contraintes topologiques peuvent lier les deux chromatides soeurs résultant de la réplication (caténanes et dimères). Ces liens topologiques doivent être résolus afin de permettre une bonne ségrégation de l'information génétique entre les deux cellules filles au cours de la division cellulaire. Les bactéries possèdent une machinerie très conservée : les recombinases à Tyrosines XerC et XerD, capables de résoudre les dimères et une partie des caténanes, en catalysant un crossing-over au site *dif*, situé dans la région Ter du chromosome. Lors de ce processus, elles réalisent successivement deux échanges de brins.

La réaction Xer est contrôlée spatialement et temporellement par une protéine du divisome : FtsK. FtsK est une translocase qui pompe l'ADN à travers le septum de division. Lorsqu'elle rencontre une synapse constituée de deux sites *dif* chargés de XerC et XerD, elle active XerD pour qu'elle initie le premier échange de brins. Dans un second temps XerC catalyse un second échange de brins indépendamment de FtsK. À ce jour le mécanisme d'activation de XerD n'est pas compris.

Certains éléments mobiles résolvent leurs états multimériques (tels que les plasmides) ou intègrent leur génome dans celui de leur hôte en détournant les recombinases XerC et XerD. On parle d'IMEXs (Integrative Mobile Element using Xer). Les éléments mobiles étudiés avant ma thèse utilisaient tous des voies de recombinaisons initiées par la catalyse de XerC et ne nécessitant pas l'activation de XerD.

Au cours de ma thèse, j'ai étudié dans un premier temps le mécanisme d'intégration / excision du phage TLC ϕ de *Vibrio cholerae*, la bactérie responsable du choléra. Par des approches de génétique, j'ai démontré que TLC ϕ définit une nouvelle catégorie d'IMEXs. Il utilise une voie de recombinaison où le premier échange de brins est catalysé par XerD et indépendant de FtsK. Mes travaux ont également montré que l'excision du phage participe à l'évolution des souches pandémiques de *V. cholerae*.

J'ai identifié un facteur phagique qui permet à TLC ϕ de contourner le contrôle de FtsK sur l'activation de XerD. Ce facteur est une protéine de fonction inconnue présentant un domaine HTH (Hélice-Tour-Hélice) et un domaine de fonction inconnue DUF3653. Ce dernier est retrouvé dans de nombreux IMEXs. Puis par des approches de biologie moléculaire, j'ai étudié le mécanisme d'action de cette protéine. J'ai reproduit la réaction de recombinaison *in vitro* et démontré qu'elle active XerD en interagissant directement avec elle.

Enfin, nous nous sommes intéressés aux disparités observées entre la recombinaison Xer chez *E. coli* et *V. cholerae*. En particulier, la recombinaison Xer semble agir seulement sur les dimères chez *E. coli* alors qu'elle est active également sur les monomères chez *V. cholerae*. Nous avons montré que ces divergences de comportement ne viennent pas des Xer elles mêmes, ni de leur activation par FtsK. Elles résultent des différences de chorégraphie et de la vitesse de ségrégation des chromosomes frères, dans ces deux bactéries et en fonction de leurs conditions de croissance.

SUMMARY

Most of bacteria have a single circular chromosome. During replication of DNA, this circularity can lead to two sister chromatids topologically linked (catenanes and dimers). These topological links have to be solved in order to allow good segregation of genetic information between the two daughter cells during cell division. Bacteria possess a highly conserved machinery : the tyrosine recombinases XerC XerD that are capable of resolving dimers and some catenanes, by catalyzing a crossover at the specific site *dif* located in the Ter region of the chromosome. During this process they realize two sequential strand exchanges.

The Xer reaction is spatiotemporally controlled by a protein of the divisome : FtsK. FtsK is a pump that translocates DNA through the septum of division. When FtsK meets a synapse that consists of two *dif* loaded by XerC and XerD, it activates XerD catalysis that initiates first strand exchange. Secondly XerC catalyzes a second strand exchange independently of FtsK. To date the activation mechanism of XerD is not well understood.

Some mobile elements solve their multimeric states (like plasmids) or integrate their genome into the chromosome of their host by using XerCD recombinases. Such integrative elements are named IMEXs (Integrative Mobile Element using Xer). The mobile elements studied before my thesis all used recombination pathways initiated by catalysis of XerC and not requiring activation of XerD .

During my PhD I studied at first the integration / excision mechanism of a new class of IMEXs using as a model the TLC phage *Vibrio cholerae*, the bacterium responsible for cholera . By genetic approaches I demonstrated that TLC ϕ uses a recombination pathway initiated by XerD catalysis and independently of FtsK . My work has also shown that the phage excision participates in the evolution of pandemic strains of *V. cholerae* .

In the second part , I identified a phage factor that allows TLC to bypass the activation of XerD by FtsK. This factor was a protein of unknown function with a HTH domain and a DUF3653 domain. DUF3653 are found in many IMEXs . Using molecular biology approaches, I studied the mechanism of action of this protein. I reproduced the recombination reaction *in vitro* and demonstrated that this factor activates XerD by directly interacting with it.

Finally, we were interested to study disparities between Xer recombination in *E.coli* and *V.cholerae*. In particular, the Xer recombination seems to act only on dimers in *E.coli* while it is also active on monomers in *V.cholerae*. We have demonstrated that these differences in behaviors do not come from Xer themselves or their activation by FtsK. They result from different choreographies of chromosome segregation between these two bacteria and are also dependent on growth rates.

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier les membres de mon jury de thèse pour avoir pris le temps de lire ce manuscrit et avoir accepté d'évaluer mon travail. La discussion et les questions qui ont suivi la présentation m'ont paru très intéressantes et agréables.

Je souhaiterais ensuite remercier tout particulièrement mon directeur de thèse F.X. Barre. Je te remercie de m'avoir fait confiance pour mener ce projet, m'avoir encouragée et d'avoir été là pour les discussions scientifiques dès que j'en ressentais le besoin. Cela a été stressant mais très valorisant pour moi que tu me fasses confiance et me laisses avoir des responsabilités allant de l'écriture d'article, la review du travail de mes pairs, amener de nouveaux logiciels ou nouvelles techniques dans l'équipe ou bien encore l'encadrement d'étudiants. Tu as cru en mes capacités et sans toi je n'aurais jamais osé candidater au prix l'Oréal pour les Femmes et la Science que je considère donc avoir obtenu en grande partie grâce à toi. Cela m'a aidé à avoir d'avantage confiance en mes capacités. Merci également d'avoir fait ton maximum pour que je parte en post doctorat avec une bonne thèse dans mes bagages. J'ai énormément appris au cours de ces quatre années et j'ai bien l'intention de continuer.

Comme la recherche est avant tout un travail d'équipe, je tiens à remercier tous les membres de mon équipe de recherche présents ou passés avec qui on a pu avoir de bons échanges scientifiques, mais aussi une ambiance de travail inoubliable. J'allais au laboratoire le matin avec le sourire. Vous êtes formidables et partir me donne l'impression de quitter une sorte de petite famille. Merci de m'avoir soutenue aussi dans les moments de doutes. Ariane David et Jean-Michel Desfontaines pour leur soutien entre thésards de l'équipe. Evelyne, un peu la maman de l'équipe et toujours prête à faire part de son expérience et donner de bons conseils. La mère Humbert (Adeline) et Christophe Possoz pour leur bonne humeur et les longs débats scientifiques (ou non). J'appuierai sur les remerciements à Christophe pour ses conseils d'orientation, son aide scientifique, ses remarques pertinentes et m'avoir aidé sur le premier jet de l'article XafT. Tu es toujours prêt à aider. Gaëlle Demarre, Elena Espinosa et Elisa Galli pour m'avoir fait part de leur expérience en tant que post-doctorantes. Jean-luc Ferat pour les discussions scientifiques et ses conseils pour mon choix de post-doctorat. Je tiens aussi à remercier l'équipe Boccard, Valentine Lagage et Marie Platel de ma team running, avec qui j'ai pu extérioriser la frustration de la thèse et qui sont devenues de vraies amies. Un merci à Julien Bischerour qui a dû supporter mes fréquentes demandes en tant que biochimiste dont j'ai repris le flambeau sur le sujet Xer.

Merci à Sarah-Morgane et Julie et Marie-Line pour les séances de Tae bo qui nous ont fait du bien. Enfin de manière générale je remercie la plupart des gens du bâtiment 26 qui sont toujours prêt à aider en cas de besoin, donner des conseils et faire part de leur expérience pour les manip problématiques (je pense notamment aux Western Blot sur *V. cholerae*). J'ai également été touchée de vous voir si nombreux à ma soutenance et par vos félicitations en personne après celle-ci.

Bien évidemment je remercierai ma famille, mes parents qui m'ont soutenue et supportée pendant ces années de thèse tel leur Tanguy. Ma sœur Nathalie qui a été très présente pour moi surtout dans les moments difficiles. Merci à mes deux amis de faculté François Mercier et Benjamin Lassus pour leur soutien et m'avoir changé les idées.

Table des matières

1	Introduction	15
1.1	Circularité du chromosome bactérien et contraintes topologiques	15
1.1.1	Généralités	15
1.1.2	Contraintes topologiques liées à la circularité du chromosome	16
1.2	La machinerie Xer	18
1.2.1	Généralités	18
1.2.2	Analyse structure/fonction des recombinases à Tyrosine et corrélation au modèle Xer	20
1.2.3	Mécanisme d'échange de brins Xer au site <i>dif</i>	36
1.3	Fonction cellulaire de la machinerie Xer et implication dans le maintien de l'information génétique	39
1.3.1	La résolution des dimères de chromosomes	39
1.3.2	Résolution des caténanes	48
1.4	Détournement de la machinerie Xer par les éléments génétiques mobiles et implication dans le transfert horizontal de gènes	51
1.4.1	Résolution des dimères de plasmides	51
1.4.2	Les IMEXs (Integrative Mobile Element using Xer)	57

1.5	Enjeux de la thèse	70
2	Résultats partie I : TLCϕ s'intègre dans la génome de <i>V.cholerae</i> en utilisant une voie de recombinaison initiée par XerD et indépendante de l'activation par FtsK - résultats publiés (<i>Midonet et al. PNAS, 2014</i>)	73
2.1	Contexte	73
2.2	Article	78
2.3	Discussion de l'article	90
2.3.1	Exploitation paradoxale de la machinerie Xer : . . .	90
2.3.2	Mécanisme d'échange de brins des IMEXs de type TLC Φ :	92
2.3.3	Mécanisme d'intégration indépendant de FtsK : . .	93
2.3.4	Contribution de TLC Φ dans l'évolution des souches toxigéniques :	96
3	Résultats partie II : Facteur d'intégration de TLC (article en préparation)	99
3.1	Contexte ayant conduit à la recherche de facteurs d'intégration	99
3.2	Papier en préparation	100
3.3	Résumé	126
3.4	Discussion détaillée	128
3.4.1	Mécanisme d'activation de XerD et modification de la coopération de liaison entre XerC et XerD	128
3.4.2	Résultats préliminaires sur la coopération de liaison entre XerC et XerD sur un site <i>dif1</i> ou <i>attPTLC</i> .	130
3.4.3	La stabilité de TLC semble dépendre de XafT . . .	134
3.4.4	Contexte ADN lors de la recombinaison	138

4 Résultats partie III : Interdépendance entre RecA et l'activité de XerCD	141
4.1 Contexte	141
4.2 La dépendance à RecA pour la recombinaison <i>dif/dif</i> ne s'explique pas par les différentes propriétés des Xer de <i>E. coli</i> et <i>V. cholerae</i>	144
4.2.1 Le test d'excision de cassette et vérification de la RecA-dépendance de la recombinaison Xer	144
4.2.2 La séparation des Ter de part et d'autre du septum de division dépend de la vitesse de croissance chez <i>E. coli</i> mais pas <i>V. cholerae</i>	148
4.3 Discussion	154
5 Discussion générale	161
5.1 XafT active-t'il véritablement XerD?	161
5.1.1 Recombinaison <i>in vitro</i> avec différents pourcentages de glycérol	163
5.1.2 Recombinaison <i>in vitro</i> avec des sites <i>dif_{E.coli}</i>	165
5.2 VGJ ϕ possède une protéine apparentée à XafT	165
5.3 Les îlots génétiques de <i>Neisseria</i> : une quatrième catégorie d'IMEXs?	169
5.4 Stratégies de stabilité des IMEXs	175
5.5 Interactions entre les différents IMEXs	176
5.6 Similitudes entre les IMEXs et les ICEs	178
6 Perspectives	181
6.1 Caractériser XafT	182
6.2 Définir le site d'interaction entre XerD et XafT	183

6.3	Comparer qualitativement la conformation de la synapse XerCD/ <i>dif</i> lors d'une activation par FtsK ou XafT	183
-----	----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----

Liste des abréviations

aa : acide aminé
ADN : acide désoxyribonucléique
attP : site d'attachement du phage
CB : site coeur de liaison (Core Binding)
CDR : Chromosome Dimer Resolution
ChrI : chromosome I de *V.cholerae*
CTD : domaine C-terminal
Cter : extrémité carboxy-terminale
CTX : cholera toxin phage
DAZ : *dif* activity zone
dif : deletion induce filamentation
DUF3653 : domain of unknow function 3653
E.coli : Escherichia coli
Flp : flippase
FRET : Förster Resonance Energy Transfer
FtsK_C : domaine Cter de la protéine FtsK avec un linker de 50 aa pour la solubilité. GI : îlot génétique
HJ : Holliday junction
HTH : Hélice-Tour-Hélice
IMEXs : integrative mobile element using Xer
IPTG : Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside
KOPS : FtsK Orienting Polar Sequence
LB : Luria Berthani
MGI : Mobilizable Genomic Island
NTD : domaine N-terminal
Nter : extrémité amino-terminale
ori : origine de réplication
PIFE : Protein Induces Fluorescence Enhancement
PMR : Plasmid Multimer Resolution
PSF : Point Spread Function
RMN : Résonance Magnétique Nucléaire
TCP : Toxin Co-regulated Pilus Ter : domaine terminal du chromosome
TFM : Tethered Fluorophore Motion
TLC : Toxin Linked Cryptic element
V.cholerae : *Vibrio cholerae*
XaT : Xer activator factor of TLC
Xer : chromosome encoded recombinase
XerKQ : mutant catalytique de Xer où la Lysine a été remplacée par un Glutamine
Xgal : 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl β -D-galactoside
YR : recombinase à Tyrosine

Chapitre 1

Introduction

1.1 Circularité du chromosome bactérien et contraintes topologiques

1.1.1 Généralités

La nature circulaire du chromosome d'*Escherichia coli* fut démontrée par François Jacob et Elie Wollman en 1961 [1]. Depuis, les études génomiques à haut débit ont démontré que le chromosome circulaire était la norme pour les Bactéries et les Archées. La plupart des bactéries possèdent un seul chromosome circulaire. Mais certaines d'entre elles en possèdent plusieurs. C'est notamment le cas des *Vibrionaceae*, *Deinococcus radiodurans*, *Brucella melitensis*, *Burkholderia mallei* ou *Rhodobacter sphaeroides* [2]. D'autres bactéries ont un ou plusieurs chromosomes linéaires comme les *Borrelia* ou *Agrobacterium tumefaciens* (pour revue sur le chromosome et les plasmides linéaires de *Borrelia* voir [3]).

Les chromosomes bactériens possèdent une origine de répllication unique *ori*. Au cours de la répllication, les fourches de répllication progressent le

long des bras de réplication. Lorsque le chromosome est circulaire, elles se rencontrent dans la région située à l'opposé de l'*ori* : la région Ter. Au cours de la réplication, l'ADN polymérase polymérise dans le sens 5'→3'. L'un des brins d'ADN (celui dans l'orientation 3'→5') est répliqué de manière continue alors que l'autre (sens 5'→3') nécessite de multiples chargements de la polymérase et est répliqué de manière discontinue. Ces brins nommés respectivement "leading strand" et "lagging strand" sont également caractérisés par le GC-skew, à savoir une modification de la richesse en G par rapport à C et en T par rapport à A. Le brin leading contient plus de Guanine et Thymine alors que le brin lagging contient plus d'Adénine et Cytosine [4, 5]. La zone de rencontre la plus fréquente des deux fourches de réplifications, et donc la région Ter, peut être prédite en analysant le GC-skew. De manière intéressante, les chromosomes bactériens sont caractérisés par le "GC content" qui correspond à l'enrichissement en GC d'une espèce bactérienne. La présence d'éléments génétiques mobiles intégrés dans le génome peut être prédite en analysant la composition en GC du génome bactérien car ces derniers ont souvent un enrichissement en GC différent de celui de la bactérie hôte.

1.1.2 Contraintes topologiques liées à la circularité du chromosome

La circularité de l'ADN peut induire deux types majeurs de contraintes topologiques. Si elles ne sont pas résolues, ces dernières conduisent à une mauvaise ségrégation de l'information génétique entre les deux cellules filles issues de la réplication. Ces deux contraintes topologiques sont les caténations entre deux chromatides soeurs et les concaténats.

La réplication de l'ADN hélical double brin introduit un lien de caténation par tour d'hélice [6]. Les caténanes correspondent à deux molécules

circulaires entrelacées et nécessitant une coupure ADN pour être séparées l'une de l'autre. Chez *E. coli* ces caténanes sont relâchés par l'action de la topoisomérase IV (voir Figure 1.1) [6].

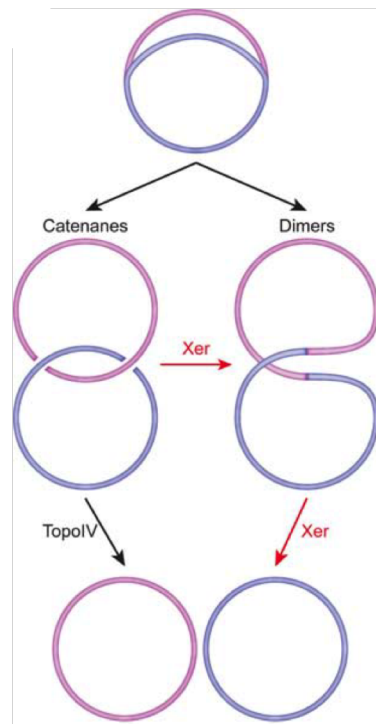


FIGURE 1.1 – **Résolution des caténanes et dimères de chromosomes** : Les cercles violets et roses représentent chacun l'un des deux chromosomes frère issu de la réplication de l'ADN. Topo IV résout les caténanes. XerCD résolvent les dimères et participent à la résolution des caténanes. *Tirée de Midonet et al. [7]*

Les concaténats également appelés dimères de chromosomes correspondent à deux chromosomes fusionnés. Ils résultent d'un nombre impair de crossing-over entre les deux chromatides soeurs issues de la réplication [8]. Pour résoudre ces dimères les bactéries possèdent une machinerie très conservée : les recombinaisons à tyrosine XerC et XerD [9]. Celles-ci ajoutent un évènement de crossing-over au niveau du site unique *dif* situé à proxi-

mité du site de terminaison de la réplication déterminé par le GC-skew [10, 11]. Le site *dif* (*deletion induces filamentation*) fut identifié comme site de recombinaison par Kuempel et al. en 1991 [12]. L'échange de brins d'ADN au site *dif* abouti à un produit consistant en deux molécules circulaires pourvues de la même information génétique et pouvant être ségrégées correctement entre les deux cellules filles [13, 12, 14, 15].

Le site *dif* est également impliqué dans la résolution des caténanes puisqu'il a été démontré qu'il existe une forte activité de la topoisomérase IV au site *dif* d' *E.coli* [16, 17].

1.2 La machinerie Xer

1.2.1 Généralités

La recombinaison Xer fut découverte en 1984 lors de l'étude de la stabilité du plasmide ColE1 [18]. Il fut remarqué que les multimères plasmidiques sont convertis en monomères afin d'assurer une bonne ségrégation entre les deux cellules filles issues de la division cellulaire. Lors de la recherche de mutants défectueux pour cette résolution des multimères, le gène *xerC* (pour chromosome encoded recombinase) fut identifié chez *E.coli* [19]. Puis une seconde recombinaisons similaire à XerC et fonctionnant de paire avec elle fut découverte et nommée XerD [14].

XerC et XerD sont des protéines appartenant à la famille des recombinaisons à Tyrosine. Bien qu'elles ne présentent que 37% d'identité entre elles, XerC et XerD d' *E.coli* sont plus proches l'une de l'autre que comparées à d'autres recombinaisons à Tyrosine et font 298 aa [14]. Des orthologues de XerC et XerD ont été identifiés dans la plupart des bactéries possédant un

chromosome circulaire [11, 9]. En cas de présence de Xer, la séquence de leur site cible *dif* a également pu être prédite sur ces chromosomes en se basant sur la séquence du site *dif* d' *E.coli* [11]. Certaines bactéries ne possèdent pas le système XerCD, mais utilisent des recombinases similaires à XerCD, pour la résolution des dimères de chromosomes. On trouve notamment les XerS chez les *Streptococci* [20] et les *Lactococci* [11]. Un sous-groupe de ϵ -protéobactéries, tel que la bactérie *Helicobacter pylori* utilise XerH [9]. Enfin un système de résolution des dimères de chromosomes utilisant XerA a été découvert chez les Archées *P. abyssy* et *S. solfataricus* [21, 22].

La structure cristallographique de XerD d' *E.coli* sans ADN a été obtenue en 1997 par *Subramanya et al.* [23] (voir Figure 1.2) .

La structure de XerD révéla de fortes similitudes avec d'autres recombinases à Tyrosines telles que l'intégrase λ Int. du phage lambda ou l'intégrase du phage HP1. Mais la plus grande similitude fut celle avec la recombinase Cre du phage P1, qui servit longtemps de modèle pour comprendre la mécanistique Xer par la suite. Cette structure démontra que XerD est constituée de deux domaines : un domaine Nter comportant 4 hélices α (αA à D) relié au domaine Cter par une séquence aa non structurée (linker). Le domaine Cter est de taille plus importante (2/3 de la protéine). Il est constitué de 10 hélices α (αE à N) et 3 feuillets β . De manière surprenante, la comparaison des domaines Cter de XerD, λ Int. et HPI Int. indique que malgré le haut degré de similarités entre les recombinases à Tyrosine, la partie la plus externe du domaine Cter est celle présentant la plus grande variabilité alors qu'elle contient le domaine catalytique (voir Figure 1.3) [23, 24, 25].

Bien que la structure de XerC n'ait pas été obtenue, les modèles prédictifs de structure secondaire pour XerC sont compatibles avec la structure

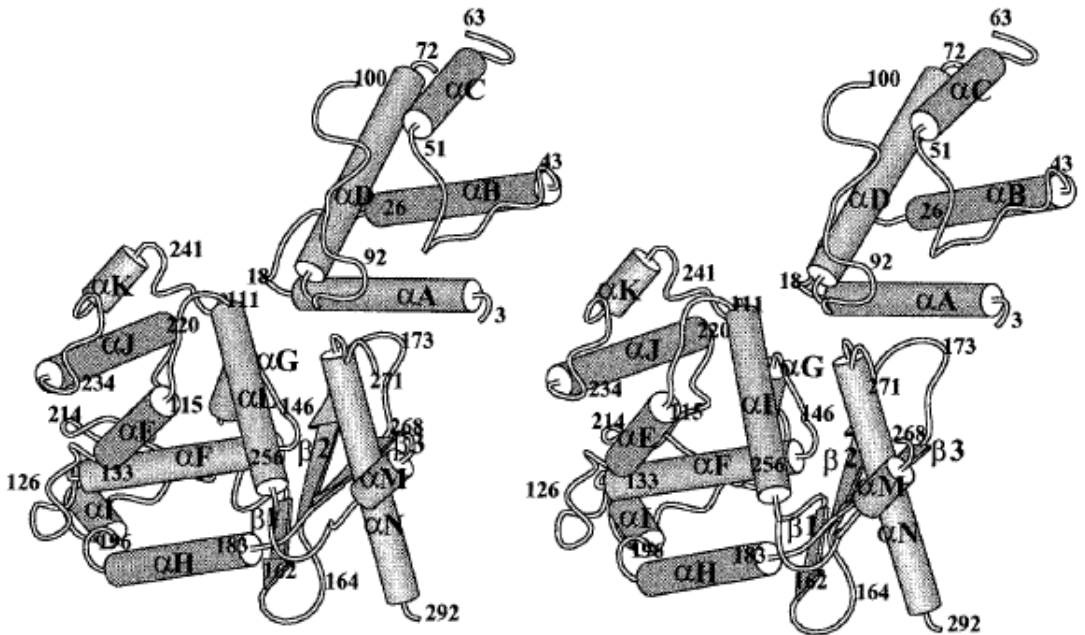


FIGURE 1.2 – **Structure cristallographique de la protéine XerD (*E. coli*)**. Figure réalisée avec le logiciel PREPPI. Les nombres indiquent les débuts et fin des éléments de structures secondaires. Les résidus absents (64-70, 101-110 et 269-270) correspondent aux résidus non cristallisés des domaines Nter, Cter et de trois boucles. Tirée de *Subramanya et al. 1997* [23]

obtenue pour XerD.

1.2.2 Analyse structure/fonction des recombinases à Tyrosine et corrélation au modèle Xer

Généralités

Les recombinases à Tyrosines (YR) constituent une grande famille de protéines catalysant des événements de recombinaison spécifique de site. Elles portent leur nom du fait qu'elles utilisent une Tyrosine pour générer une cassure de brin d'ADN qui est indispensable lors du proces-

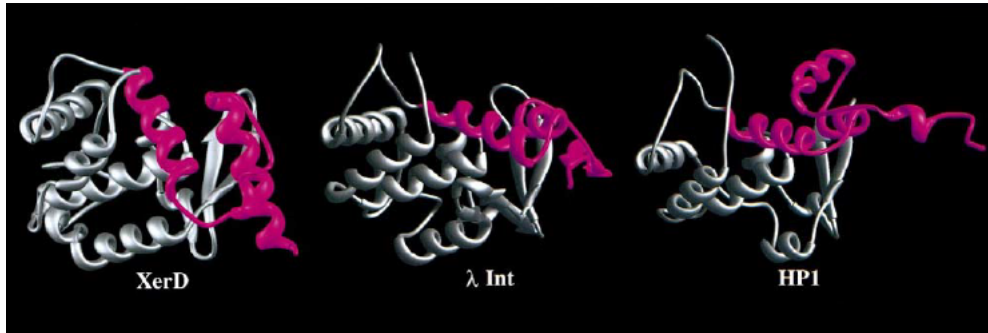


FIGURE 1.3 – Comparaison de la structure des domaines Cter de XerD (*E. coli*), λ Int et HPI Int. Les régions avec le plus grand degré de similitude sont indiquées en gris. Les différences structurales majeures (en rose) sont situées dans le segment polypeptidique qui se prolonge à partir du motif II à l'extrémité du domaine Cter. Tiré de *Subramanya et al. 1997* [23].

sus d'échange de brins. De manière générale, deux sites cibles vont être liés à deux monomères de YR chacuns et rapprochés par des interactions de type protéines-protéines. Ces interactions forment alors un complexe nucléo-protéique impliquant un tétramère de recombinases (voir Figure 1.5). La plupart du temps les quatre monomères sont identiques mais dans certains cas comme XerCD, ou FimBE [26] deux recombinases différentes lient chaque site cible.

Les recombinases à Tyrosine sont très répandues dans le règne bactérien et chez les éléments génétiques mobiles intégratifs (transposon, phages...). Bien que leurs mécanismes biochimiques soient proches, leurs implications biologiques peuvent être très variées :

- **résolvases** : lorsqu'un évènement de recombinaison spécifique de site est réalisé entre deux sites situés sur la même molécule d'ADN et en orientation directe (voir Figure 1.4C). La recombinaison s'effectue donc en intramoléculaire et permet une bonne ségrégation de l'in-

formation génétique entre les deux cellules filles issues de la division cellulaire. C'est le cas pour la CDR et la résolution des dimères de plasmide avec les recombinases Xer, ou bien les recombinases Cre du phage P1.

- **invertases** : si la recombinaison en intramoléculaire est effectuée entre deux sites en orientations inverses (voir Figure 1.4B) . Ce mécanisme est entre autres un moyen de régulation de l'expression de certains gènes. C'est le cas de *fimBE*, dont l'inversion d'une région de 3000bp permet la régulation de l'expression du *fimbrae* de type I chez *E. coli* [26].
- **intégrases** : Lors de l'intégration d'éléments génétiques mobiles intégratifs dans le chromosome de leur hôte, la recombinaison s'effectue en intermoléculaire entre deux ADN contenant un site cible (voir Figure 1.4A). L'élément génétique mobile peut alors être transmis verticalement. C'est par exemple le cas pour les phages lysogéniques, les îlots génomiques ou les intégrons. L'un des cas les plus étudiés fut notamment l'intégrase du phage λ (pour revue [27]). Dans la plupart des cas, les recombinases catalysant l'intégration sont les mêmes utilisées pour l'excision, et tout comme lors de la CDR, les deux sites impliqués sont en répétition directe sur le même ADN.

Le mode de coupure des recombinases à Tyrosine est séquentiel : deux protomères opposés sont actifs et les deux autres inactifs. La première paire de protomères réalise un premier échange de brins donnant lieu à l'intermédiaire de réaction appelé jonction de Holliday (HJ). Puis les deux protomères initialement inactifs deviennent actifs et catalysent le second échange de brins (voir Figure 1.5).

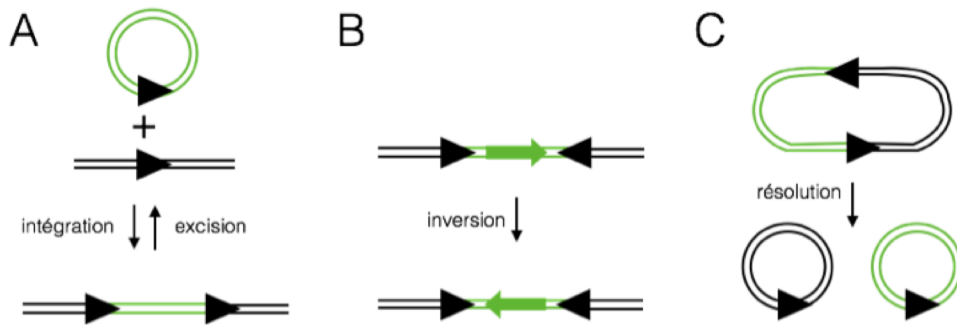


FIGURE 1.4 – Schéma représentant les différents évènements de recombinaisons pouvant être catalysés par les recombinases à Tyrosine. Le triangle noir indique le site cible de recombinaison et son orientation. La flèche verte renseigne sur l'orientation de la séquence dans le cas des inversions.

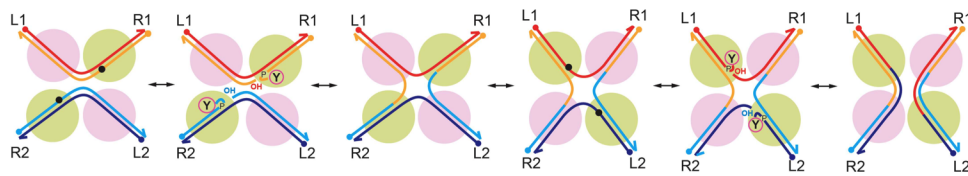


FIGURE 1.5 – **Recombinaison spécifique de site des recombinases à Tyrosine** : chacun des deux sites cibles est lié par deux monomères de recombinases. Les deux sites sont plans et arrangés de manière anti-parallèle. En vert est indiqué le couple de recombinases actives dans la synapse. Y : représente la Tyrosine catalytique réalisant l'attaque nucléophile qui donne lieu à la liaison 3'-phospho-tyrosile. OH : indique l'extrémité 5'-OH libérée après clivage par la recombinase à Tyrosine. La gauche et la droite de chaque site sont indiquées par L1, L2, R1 et R2. La réaction engage le clivage et l'échange d'une paire de brins d'ADN pour donner la HJ. Après isomérisation, la HJ est résolue en produit grâce à un second échange catalysé par la seconde paire de recombinases devenues actives. Le cercle noir indique le phosphate ciblé lors de chaque échange. *Tiré de M. Jayaram et al. [25]*

Activité catalytique

La signature caractéristique des recombinases à Tyrosine consiste en une Tyrosine nucléophile associée à cinq acides aminés très conservés : Arg-

I(173/148), Lys- β (201/172), His-II(289/244), Arg-II(292/247) et His-III(270)/ou Trp(315) (en parenthèses sont indiquées en caractères fins ou gras les positions de ces aa pour Cre et pour XerD d'*E.coli* respectivement) [25]. Dans le cas de Xer le cinquième acide aminé est une Histidine. Un simple alignement des séquences protéiques de XerC et XerD de *V. cholerae* avec celles d'*E.coli* permet de localiser facilement ces acides aminés clés chez les Xer de *V.cholerae* (voir Figure 1.6).

```

CLUSTAL 2.1 multiple sequence alignment
XerCvibr -----MKNDERTPLPDALAQPLERFYAYLHTEKGLSLYTORNYKQQLETMTQYLVLQVQGLT 55
XerCcoli -----MTD-----LHTDVERYLRYLSVERQLSPITLLNYQRQLEAIFNFASENGLQ 46
XerDvibr MVSEALSPD-----QGLVEQFLDTMWFERGLAENTVASYRNDLSKLLLEWMAQQYR 51
XerDcoli -----MKQD-----LARI EQFLDALWLEKNAENTLNAYRRDLSMMVEWLHHRGLT 46
      .:      *:::   : *: *: * *:::*. : :. .

XerCvibr HWTQLDSAWVRQLVMQGKRQGMKASSIATRLSSLRSFLDFLILRGLQANPAKGVSAAPRK 115
XerCcoli SWQQCDVTMVRNFAVRSRRKGLGAASLALRSLRSLRFFDVLVSRQNELKANPAKGVSAAPKA 106
XerDvibr -LDFISFAGLQEQSWLSEQNYKPTSKARMLS A I R R L F Q Y L H R E K V R A D D P S A L L V S P K L 110
XerDcoli -LATAQSDDLQALLAERLEGGYKATSSARLLSAVRRLFQYLYREKFRDDPSAHLASPKL 105
      . ::     . . .* * *: * * * * : * : * : * : : * : : * : : * :

                                            Arg-I
XerCvibr QRTLPKNLVDDEMAQLLEVTD-DDPLSIRDRAIMELMYGAGLRLAELVLSIDIKDVLNLSSEG 174
XerCcoli PRHLPKNIDVDDMNRLLDIDI-NDPLAVRDRAMLEVMYGAGRLSELVGLDIKHLDSLSEG 165
XerDvibr PTRLPKDLSEAQVEALLSAPDPQSPLERDKAMLELLYATGLRVTELVSILTMMENMSLRQG 170
XerDcoli PQRLPKDLSEAQVERLLQAPLIDQPLELRDKAMLEVLYATGLRVSSELVGLTMSDISLRQG 165
      ***: . : : * . : : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *

                                Lys- $\beta$ 
XerCvibr EIRVIKGNKERKVVFAQQAQEWVGKWLKLS--QLADS A ETALFVSKLGTIRISHRSVQK 232
XerCcoli EVVVMGKSGKERLPIGRNAVAVIEHWLDLR---DLFGEEDDALFLSKLGKRISARNVQK 222
XerDvibr VVRVMGKGGKERLVPMGENAIEWITFLQOGRSLLLGEQTSDIVFPSSRQQQMTROTTFWH 230
XerDcoli VVRVIKGNKERLVPLGEEAVYWLETYLEHGRPWLLNGVSDVLPFSSQRAQQQMTROTTFWH 225
      : * : * : * : * : : . : * * * : : . * * * * * * * * * * : * * . . : : : . . :

                        His-II  Arg-II                                His-III  Tyr
XerCvibr RMAEWGKQKAVAS-HISPKLRHSPATHMLESSNLRVAVQELLGHENIATTQIYTHLDFQ 291
XerCcoli RFAEWGIKQGLNN-HVHPhKLRHSPATHMLESSGDLRGVQELLGHANLSTTQIYTHLDFQ 281
XerDvibr RIKHYAVIAGIDVEKLSPhVLRHAFATHLLNYGADLRVQMLLGHSDLSSTTQIYTHVATE 290
XerDcoli RIKHYAVLAGIDSEKLSPhVLRHAFATHLLNHGADLRVQMLLGHSDLSSTTQIYTHVATE 285
      * : . : . : : * * * * : * * : * : * : * * * * : : * * * * * * * * * * * :

XerCvibr HLAQVVDQAHPRARKKNDKDD 311
XerCcoli HLASVYDAAHPRAKRKG--- 298
XerDvibr RLKQLHNEHHPRA----- 303
XerDcoli RLRQLHQQHHPRA----- 298
      : * : : : * * * *

```

FIGURE 1.6 – Alignement des XerCD de *V.cholerae* avec celles d' *E.coli*, à partir du logiciel Clustal : En jaune sont indiqués les 5 acides aminés intervenant dans la création d'un environnement favorable à l'activité catalytique par la Tyrosine (également en jaune). "*" indique que les résidus à cette position sont exactement les mêmes. ":" indique qu'ils sont similaires en terme de propriété. ". " signifie que les résidus sont plus ou moins similaires. L'absence de marque signifie qu'il n'y a pas de propriétés communes. Le brin "top" est représenté dans le sens 5'→3'.

Les études réalisées sur Flp et Cre, suggèrent que la Lysine servirait

à stabiliser le groupe sortant 5'-OH formé après clivage [25]. Le rôle de l'Histidine II serait de retirer le proton de la Tyrosine, pour l'activer dans l'attaque nucléophile. Les deux Arginines conservées balancent les charges négatives du groupement oxygène du phosphate "scissile" (voir Figure 1.7). D'après les études réalisées sur Cre, seuls deux des cinq aa conservés se-

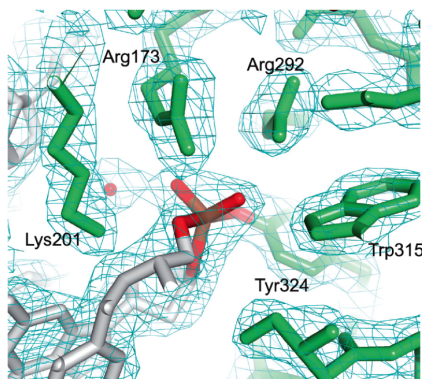


FIGURE 1.7 – **Structure de l'état de transition Cre - ADN** : Densité pondérée électronique $2F_o - F_c$ suivant raffinement à 2,3Å de résolution. La carte est profilée à 1.2σ . His289 n'est pas visible. *Tiré de Gibb et al. [28]*

raient strictement indispensables et irremplaçables pour avoir au moins 5% de l'activité de recombinaison, tout en gardant une capacité de liaison à l'ADN : la Tyrosine nucléophile et la Lysine. Une modification des codons codant pour l'une des deux Arginines conservées, réduit simplement l'efficacité de recombinaison. Les autres aa affectent peu l'efficacité de recombinaison lorsqu'ils sont mutés [28]. On peut donc créer deux types de mutants catalytiques de Xer en mutant soit la Tyrosine soit la Lysine. P. Zawadzki et al. [29] ont démontré l'absence d'activité catalytique du mutant Lysine de XerCD d'*E.coli*. Ce mutant pourra être préféré au mutant Tyrosine suspecté d'être également affecté pour la fixation sur le site cible [30].




<u>Chromosomal <i>dif</i> sites</u>			
<i>E. coli dif</i>	GGTGCGCATAA	TGTATA	TTATGTTAAAT
<i>H. influenzae dif</i>	ATTGCGCATAA	TATAAA	TTATGTTAAAT
<i>P. aeruginosa dif</i>	GATGCGCATAA	TGTATA	TTATGTTAAAT
<i>S. oneidensis dif</i>	ACTGCGC CAA	TGTATA	TTATGTTAAAT
<i>X. campestris dif</i>	ATTGCGCATAA	TGTATA	TTATGT CAGGA
<i>Y. pestis dif</i>	GGTGCGCATAA	TGTATA	TTATGTTAAAT
<i>V. cholerae dif1</i>	AGTGCGCAT TA	TGTAT G	TTATGTTAAAT
<i>V. cholerae dif2</i>	AATGCGCAT TA	CGTGCG	TTATGTTAAAT
	XerC binding site	central region	XerD binding site

FIGURE 1.8 – **Alignement des sites *dif***. Le weblogo (en bleu) a été généré à partir de 27 sites *dif* putatifs de γ -protéobactéries. Les sites de fixation de XerC et XerD sont indiqués par une ligne noire. Modifié à partir de M.-E. Val et al. 2008 [31].

Liaison à l'ADN

Les recombinaisons XerC et XerD reconnaissent chacune une séquence ADN de 11pb. Ces deux sites sont positionnés de manière inversée l'un par rapport à l'autre et séparés par une région centrale de 6 à 8 paires de bases. La région centrale est le lieu de coupure et ligation de l'ADN (voir Figure 1.8). L'homologie entre les deux régions centrales des deux sites recombinant est cruciale afin de permettre l'échange de brins (voir sous-section "mécanisme d'échange de brins").

Dans la fonction biologique de résolution des dimères de chromosomes (CDR) le site cible est *dif* : un site unique situé dans la région Ter et appelé ainsi pour "*délétion induces filamentation*". Bien que le site *dif* soit également très conservé chez les bactéries (voir Figure 1.8) le site de fixation de XerD semble plus conservé que le site de fixation de XerC.

Par convention on nomme "top" le brin clivé par XerC et "bottom"

le brin clivé par XerD [32]. Les termes "haut" et "bas" désignent depuis *Blakely et al. 1997* la première paire de brins (top) et la seconde paire de brins (bottom) qui sont échangées lors de la recombinaison des sites plasmidiques *cer* et *psi* et observées *in vivo* et *in vitro* (voir "résolution des dimères de plasmides") [33, 34].

Comme les topoisomérases de type IB, la position du site catalytique des recombinases XerC et XerD leur permet d'être actives dès leur fixation sur le site cible et de provoquer ainsi le relâchement de l'ADN [32]. Cependant des études *in vitro* suggèrent qu'en présence des deux partenaires sur le site de recombinaison, l'interaction des deux recombinases au sein de l'hétérodimère inhibe l'activité topoisomérase [35].

Régions impliquées dans la reconnaissance du site *dif* :

Les données cristallographiques de Cre sur son substrat ADN (site loxP) montrent que les domaines Nter et Cter des recombinases interagissent avec l'ADN sur deux faces opposées (voir Figure 1.9) [36]. Dans le domaine de liaison au site coeur (CB = core-binding domain) de Cre, les hélices αB et αD du domaine Nter sont croisées orthogonalement et contiennent la séquence de liaison spécifique à l'ADN. Les résidus situés à l'extérieur de ces deux hélices pénètrent le grand sillon de l'ADN. Ils se trouvent alors à une position favorable pour interagir aussi bien avec le phosphate du sucre de l'ADN et les bases. La structure de XerD n'a été cristallisée qu'en absence de substrat ADN mais la comparaison des CB avec Cre montre de fortes similitudes (voir Figure 1.10) [37]. Les hélices αB , αC et αD sont fortement conservées.

Ces données structurales suggèrent que les hélices équivalentes chez

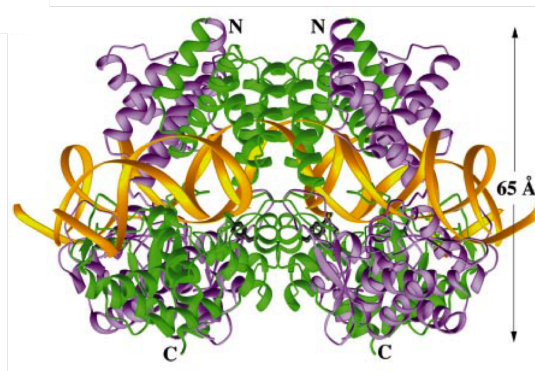


FIGURE 1.9 – **Structure en représentation en ruban d'un dimère Cre sur un site *loxA* (dérivé de *loxP*)** : Le dimère de recombinases Cre est représenté en vert et violet. La sous-unité réalisant le clivage est en vert. Les rubans continus jaunes représentent l'ADN non clivé. Les positions approximatives des domaines Nter et Cter sont indiquées par les lettres N et C respectivement. *Tirée de Guo F. et al. 1997 [36]*

XerD participent aussi à la reconnaissance spécifique du site. Cette hypothèse est soutenue par les données génétiques d'analyses structures/fonctions puisque l'insertion d'un pentapeptide dans les hélices αB et αD du domaine Nter et αG et αJ du domaine Cter de XerD affecte la capacité de liaison à l'ADN [24]. Au niveau du Cter ce sont donc les hélices αG et αJ , impliquées dans un motif hélice-tour-hélice (HTH) caractéristique des protéines de liaison à l'ADN, qui semblent participer au CB.

Cependant en contraste avec la structure de Cre, le domaine CB de XerD semble "sur-replié" sur le domaine catalytique. Cette différence est supposée résulter de l'absence du substrat ADN [37].

Analyse fonctionnelle de la séquence du site *dif* :

Contrairement à la région centrale dont l'homologie de séquence entre les deux sites recombinant est très importante; les séquences de fixation pour XerC et XerD de 11 pb peuvent varier sensiblement d'un site à l'autre. En effet, toutes les bases des sites de fixation du site coeur ne semblent

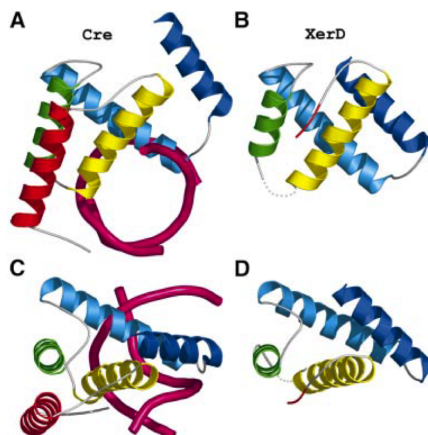


FIGURE 1.10 – Comparaison des structures obtenues de **XerD(1a0p)** et **Cre(4crx)**. Les hélices α du domaine Nter sont représentées de 4 couleurs différentes. αA = bleu foncé, αB = bleu clair, αC = vert, αD = jaune, αE = rouge. L'hélice αE est absente chez XerD. Les hélices B et D se croisent de manière orthogonale dans le grand sillon de l'ADN pour Cre. l'ADN est représenté par une ligne en magenta. A et B : Vu le long de l'axe hélical pour Cre et définition de l'axe de XerD de manière à avoir le plus d'alignement. C et D : Rotation de 80 degrés par rapport à l'axe x. Figure préparée avec le logiciel Pymol. Tirée de B.M. Swalla et al 2002 [37]

pas avoir la même importance pour la reconnaissance et la liaison de la recombinase. Les études réalisées sur les Xer d'*E.coli* et les sites compatibles pour la recombinaison (*dif* et sites de résolutions de multimères de plasmides) ont démontré qu'il y avait plus de variabilité dans la région de fixation de XerC que celle de XerD [38]. Les recombinases interagissent avec le site *dif* comme suivant : les Guanines et Thymines dans le grand sillon, les Adénines dans le petit sillon de l'ADN du site *dif*. Les modifications de bases n'impactent pas toutes de la même manière la liaison des recombinases [38].

Coopérativité de liaison à l'ADN :

Chaque recombinase se lie à un demi-site. XerC d'*E.coli* est peu affine et

semble instable sur un site *dif*_{*E.coli*} ou *cer*. Cependant en présence de XerD, l'affinité de XerC est augmentée. Le K_D est alors estimé être 40 à 160 fois plus bas. Même si cette abaissement de K_D n'a pas pu être défini pour XerD lorsqu'un site est occupé par XerC, la fixation de XerD sur *dif* est également plus importante en présence de XerC. Les recombinases XerC et XerD se fixent donc de manière coopérative au site coeur [14, 38]. En utilisant des demi-sites *dif*, *G. Blakely et al.* ont démontré que grâce à cette coopérativité de liaison, XerC peut lier un ADN non spécifique si un XerD était lié à l'autre demi-site *dif* spécifique de sa séquence de fixation [14]. Cette capacité de coopérativité de liaison est portée par l'hélice αM des Xer [39, 40]. Cette hélice est présente dans le motif II (voir Figure 1.13) et est très conservée chez les recombinases à Tyrosine. Son équivalent chez Cre, divisé en hélices αL et αN , forme une partie de la poche hydrophobique qui interagit avec l'extrême Cter des différents monomères de Cre [36].

Synapse Xer : hétérotétramère et domaines d'interactions XerC-XerD

Lors d'évènements de recombinaison spécifique de sites quatre brins d'ADN sont coupés et reliés au niveau de deux *loci* dans un génome. Ces réactions se produisent au sein d'un complexe composé de quatre enzymes liées sous forme de dimères sur deux sites d'ADN (voir Figure 1.5). Dans la plupart des cas, les quatre monomères composant le tétramère sont identiques. Cependant dans le cas de la recombinaison Xer deux protéines XerC et XerD forment l'hétérotétramère [19, 14]. Chaque site *dif* est donc lié par une protéine XerC et une protéine XerD. Les données structurales obtenues sur Cre et Flp suggèrent que les deux sites *dif* sont disposés en orientation antiparallèle dans la synapse et sur un même plan [28, 41, 42]. Les différentes structures obtenues pour le système Cre sur différents intermédiaires

de réaction ont permis d'avoir une approche détaillée des interactions moléculaires au cours d'une réaction de recombinaison. Dans un tétramère de Cre, le couple de recombinases actives correspond au couple d'enzymes donnant en *cis* son hélice αN située à l'extrême Cter [36] (voir Figure 1.11). Dans cette conformation l'hélice portant la tyrosine catalytique (hélice αM dans le cas de Cre) se trouve alors proche du phosphate scissile.

Les paires de Xer identiques sont donc disposées selon la diagonale de ce plan. Deux recombinases étant impliquées dans ce complexe il est donc légitime de se demander quels sont les mécanismes moléculaires déterminant laquelle des deux réalisera le premier échange de brins et quels sont les mécanismes régulant cette activité.

Bien qu'elle ait été obtenue sans ADN, la structure de XerD de *E. coli* suggère que la synapse XerCD est similaire à une synapse Cre. Les modèles actuels proposent donc que la paire de recombinases actives dans une synapse Xer correspond à celle donnant son bras extrême Cter en *cis*. En 1997 et 1999 *Hallet et al.* analysèrent par des approches de mutagénèse les régions semblant impliquées dans l'interaction entre XerD et XerC [43, 44]. Une première approche consista à insérer aléatoirement une séquence génétique codant pour un pentapeptide, dans la séquence ADN de XerD de *S. typhimurium* (Figure 1.12 pour voir les insertions du pentapeptide par rapport à la structure de XerD). Le XerD de *S. typhimurium* partageant 94% d'identité avec celui de XerD d'*E. coli*, l'analyse structure/fonction peut se référer à la séquence de XerD d'*E. coli* obtenue par *Subramanya et al.* [23]. Cette étude révéla que l'insertion du pentapeptide à la position 247 située dans le motif II (hélice αL) du bras Cter de XerD affecte la capacité de coopération de liaison à l'ADN entre XerC et XerD, alors que les autres fonctions telles que la liaison de XerD seule à l'ADN, et l'activité

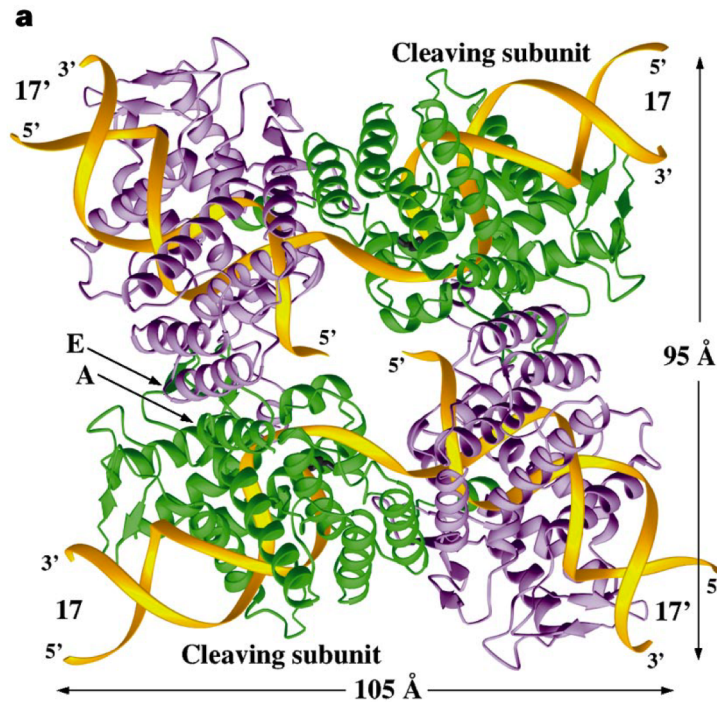


FIGURE 1.11 – **Structure d'une synapse Cre/loxA en cours d'échange** : Vue depuis le domaine Nter, parallèle à la dyade de symétrie et à l'axe de la pseudo HJ branchée. Les positions approximatives du Nter et du Cter sont indiquées. Les brins de l'ADN non clivé sont dessinés en continu. Les hélices E et A sont indiquées. En vert est représentée le couple de recombinaisons actives et ayant réalisé le clivage. Le couple de recombinaisons actives (en vert) donne son Cter en *cis*. *Tirée de Guo F. et al. 1997* [36]

catalytique de XerD ne sont pas affectées (voir localisation motif II Figure 1.13A) [43, 24].

Un alignement des motifs II conservés, montre que les trois acides aminés situés à la fin de l'hélice α L des Xer et au début du coude entre α L et α M, sont différents entre XerC et XerD. Alors que XerC présente un tripeptide ESS, XerD arbore un tripeptide NHG (voir Figure 1.13A). L'équivalent de ce motif chez Cre est le tripeptide RAG. La seconde approche consista donc à inverser les motifs ESS et NHG des XerC et XerD, afin d'étudier

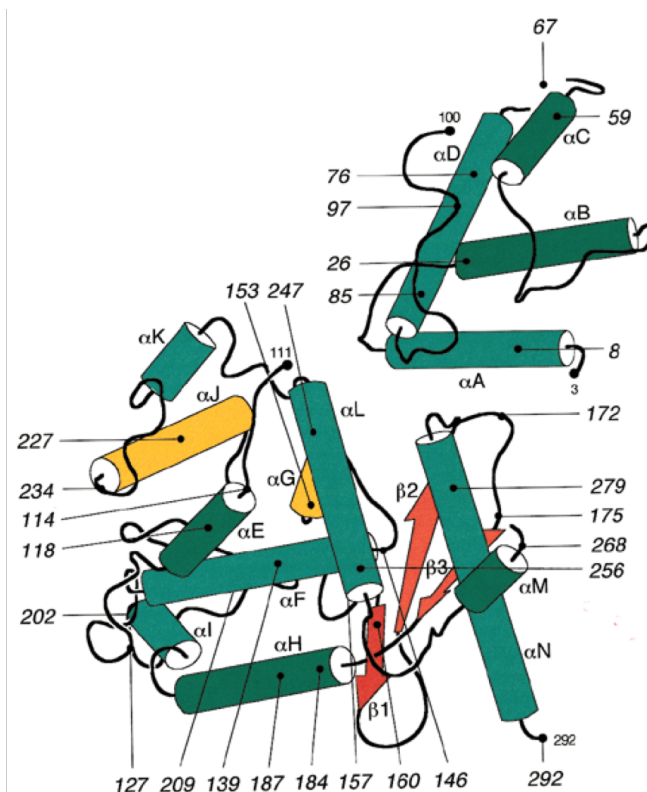


FIGURE 1.12 – Localisation des insertions du pentapeptide dans la protéine XerD de *S.typhimurium*. La représentation tridimensionnelle est celle du XerD de *E.coli* obtenue par Subramanya et al., 1997 [23]. Les domaines Nter et Cter sont en haut et bas respectivement. Les deux domaines sont reliés par 26 aa dont 16 forment une boucle et les 10 autres sont non structurés. Les hélices α et feuillet β sont respectivement représentés par des cylindres verts et des flèches rouges. Seules les hélices α G et α J sont en jaune car elles sont comprises dans une structure de type hélice-tour-hélice. Les chiffres indiquent les positions d'insertion du pentapeptide. Tiré de Cao Y. et al. [24]

l'impact sur le contrôle de la catalyse. L'altération du bras Cter de XerC donné en *cis* à XerD, favorise les échanges de brins catalysés par XerD. Inversement, altérer le bras Cter de XerD donné en *cis* à XerC favorise les échanges de brins réalisés par XerC. Il existe donc une régulation de l'activité des Xer par interactions allostériques via ce bras peptidique à l'extrême Cter.

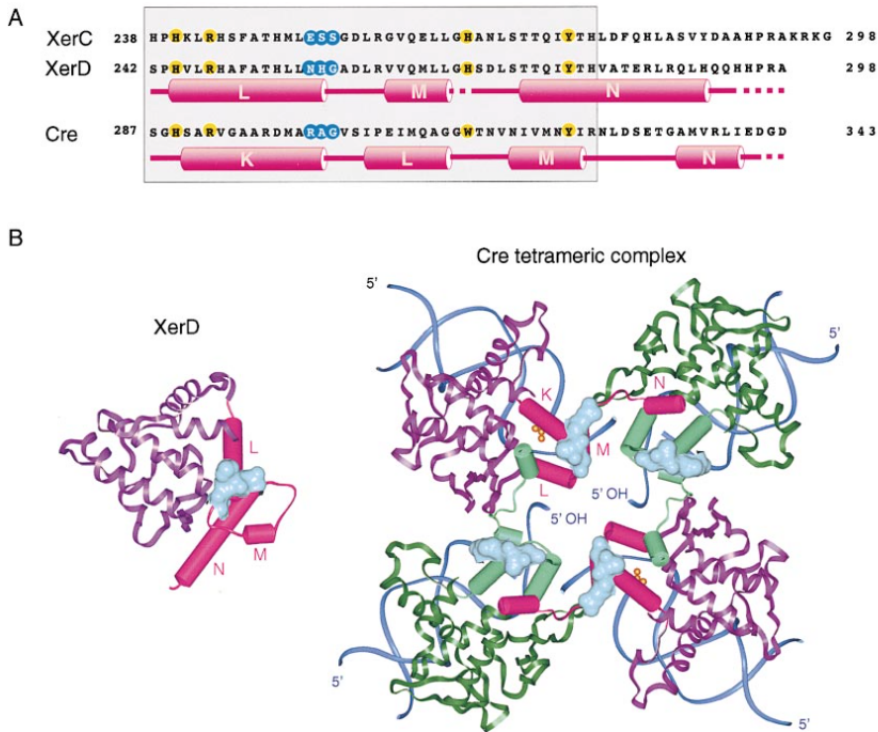


FIGURE 1.13 – **Structure et séquence des recombinases.** A) Alignement des structures primaires et secondaires des Cter de XerC, XerD et Cre. Le motif II conservé est encadré en gris. Les acides aminés impliqués dans la catalyse sont encerclés en jaune. Les tripeptides NHG-ESS divergeant entre XerC et XerD et leur équivalent RAG chez Cre, sont entourés en bleu. Les hélices α de XerD et Cre sont représentées par des cylindres roses. Les pointillés indiquent les résidus désordonnés. B) Gauche : Structure de XerD de *Subramanya et al. 1997*. Droite : structure de Cre liée de manière covalente à l'ADN. Le couple de recombinases représentées en violet a clivé l'ADN pour former le lien 3'-phosphotyrosine (*Guo et al. 1997*). Les groupes phosphates de l'ADN clivé sont représentés en jaune. Les groupements Nter de Cre ont été retirés pour plus de lisibilité. Les hélices α L, M, N du Cter de XerD et K, M, L, N du Cter de Cre sont représentées par des cylindres. Les tripeptides NHG et RAG sont représentés par des surfaces bleues claires. *Tiré de Hallet et al. 1999* [44]

Le modèle proposé est que la synapse Xer oscille entre deux états conformationnels, l'un favorable pour l'échange médié par XerC et un autre favorable pour l'échange par XerD. On parlerait alors de synapse "pro-XerC"

ou "pro-XerD". Lors du double échange de brins il y a donc une activation séquentielle (voir Figure 1.13) d'un couple de recombinases puis de l'autre. Un switch enzymatique des sous-unités C_{ter} active ou désactive la recombinase. Dans l'hétérotétramère, l'activation ou l'inhibition d'un monomère donné est dictée par les deux monomères voisins qui seront dans l'état d'activation inverse.

Liaison et directionnalité de la recombinaison :

Le contrôle de l'activité des recombinases XerCD est un point clé afin d'éviter la formation de dimères, multimères, des événements d'inversions ou de délétions. Dans le cas des systèmes de recombinaison utilisant quatre monomères identiques tels que Cre ou Flp, ce contrôle dit "directionnel" se fait grâce à l'asymétrie de la région centrale. Ainsi seuls des sites en orientations antiparallèles peuvent recombiner puisqu'en orientations parallèles les séquences ADN échangées ne seront pas homologues et ne pourront pas être stabilisées par des interactions de type Watson et Crick. Modifier la région centrale pour la rendre symétrique conduit à une perte de ce contrôle (voir Figure 1.14) [45].

La recombinaison XerCD utilisant un hétérotétramère de recombinases, l'asymétrie du complexe ne dépend pas uniquement de la région centrale. Les deux sites de fixations de 11 pb sont différents et sont liés spécifiquement par une recombinase XerC ou XerD. Un assemblage synaptique en orientations parallèles ne permet pas les interactions cycliques nécessaires aux recombinases et la synapse formée est alors abortive. Seuls les échanges entre sites en orientations antiparallèles sont possibles. Rendre symétrique la région centrale n'enlève pas cette directionnalité imposée par le site [14].

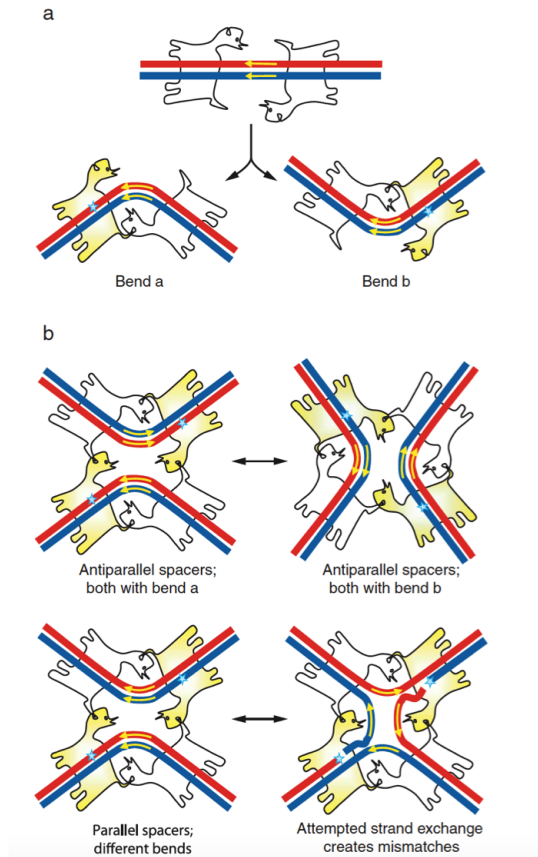


FIGURE 1.14 – **Contrôler l’issue de la recombinaison** : (a) Détermination du brin clivé en premier. Le duplex initial de recombinases peut courber l’ADN de deux façons différentes. Cela détermine quel brin est clivé en premier (étoiles bleues). Dans tous les cas étudiés, le protomère activé est celui dont la queue C-terminale est liée par l’autre. (b) Ces deux duplex courbés différemment peuvent être combinés en trois différents complexes synaptiques : deux plus productifs avec des orientations antiparallèles (en haut) et un non-productif en orientations parallèles (en bas). *Tirée de Grindley et al. 2006 [46]*

1.2.3 Mécanisme d’échange de brins Xer au site *dif*

L’échange de brins est réalisé au sein d’un complexe nucléoprotéique impliquant les deux sites ADN à recombinaison et un hétérotétramère constitué de deux XerC et deux XerD. Le clivage et l’échange de brin se déroulent de manière diagonale. Un premier couple de recombinases réalise

le premier échange de brins. De manière similaire au système Cre, les recombinaisons Xer clivent l'ADN cible en *cis* entre leur site de fixation et la région centrale [32, 36, 42, 23]. Le groupement hydroxyle de la Tyrosine catalytique attaque le phosphate scissile de la liaison phosphodiester de l'ADN qui a été fragilisée par l'environnement de la poche catalytique de la recombinaison. Cette substitution nucléophile crée d'une part une liaison covalente de type phosphotyrosyle entre la recombinaison et l'ADN en 3', d'autre part libère une extrémité 5'-OH (voir Figure 1.5). L'extrémité 5'-OH labile peut soit attaquer de nouveau le même phosphate, soit envahir le brin complémentaire du site opposé et attaquer le phosphate de la liaison phosphotyrosyle opposée. Les données cristallographiques obtenues pour Cre sur un site *loxP* suggèrent que l'homologie est testée sur trois bases [47]. Le segment d'ADN de 3 pb est ensuite stabilisé par des interactions de type Watson-Crick ou Wooble. Cela permet à l'extrémité 5'-OH d'attaquer la liaison phosphotyrosyle du complexe recombinaisons/ADN adjacent. Une liaison phosphodiester ADN/ADN est ainsi recréée. Ce premier échange de brins donne lieu à la formation de l'intermédiaire de réaction appelé Jonction de Holliday (HJ).

Comme détaillé dans la partie traitant des domaines d'interactions entre les recombinaisons au sein de l'hétérotétramère, le couple de recombinaisons actif correspond à celles donnant leur extrémité Cter en *cis*. Une isomérisation du complexe de recombinaison est donc nécessaire pour permettre l'activation du second couple de recombinaisons initialement inactif. Un second échange de brins basé sur le même mécanisme que le premier va donc être catalysé par l'autre couple de recombinaisons et résoudre la HJ en produit. L'échange de brins est dit séquentiel.

Une homologie des régions centrales entre les deux ADN partenaires est donc requise pour permettre l'échange de brins. Bien que différents sys-

tèmes aient évolué en outrepassant cet aspect (voir partie sur les IMEXs), l'absence d'homologie est attendue comme étant défavorable à l'échange de brins soit parce que la HJ n'est pas formée, soit parce qu'elle est instable et reconvertie en substrat. Si l'homologie est présente sur une grande région ADN des phénomènes de migration de la structure branchée seront alors observés en absence de recombinaisons [48, 49, 50, 51]. L'étude du mécanisme de recombinaisons et des différentes étapes le composant fut permise grâce au développement de deux outils. L'un est l'utilisation de mutants catalytiques des recombinaisons. Le second est l'utilisation d'hexapeptides.

En effet, les études réalisées notamment sur Cre, λ Int., Flp et Xer ont démontré que la HJ peut être bloquée par des hexapeptides riches en acides aminés aromatiques qui inhibent l'échange de brins [52, 53, 54, 55, 56]. Plus précisément les données cristallographiques réalisées sur Cre indiquent que ces hexapeptides se lient dans la région centrale au niveau de la jonction entre l'ADN et la recombinaison. Ils interagissent avec les bases qui sont exposées au solvant et situées à la jonction de la branche. Cette liaison peptidique induit des changements conformationnels importants des brins d'ADN qui affectent la géométrie du site actif des recombinaisons [52].

Dans le cas de la recombinaison XerCD, le complexe nucléoprotéique implique deux types de monomères différents. Il existe alors plusieurs voies de recombinaison possibles selon si le premier échange de brins est réalisé par XerC ou XerD (voir Figure 1.15). La HJ résultant de cet échange peut ensuite être résolue de deux manières. Soit la HJ est résolue par le second couple de recombinaisons et donne lieu à l'obtention de deux produits identiques. Soit la fourche de réplication passe au travers de la HJ donnant lieu d'une part à un produit d'autre part à une molécule équivalente au substrat initial.

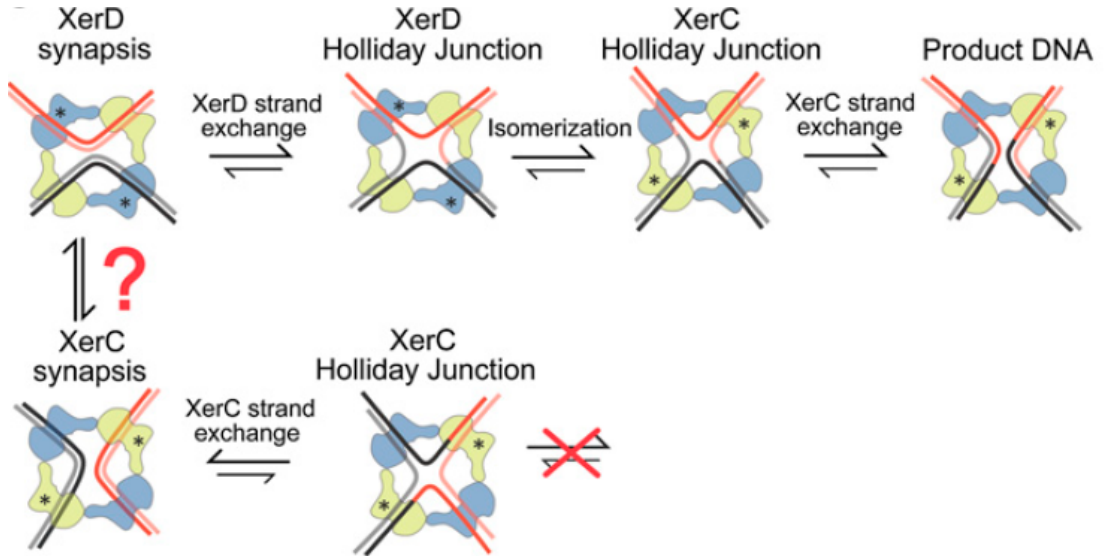


FIGURE 1.15 – Les différentes voies de recombinaison possibles pour XerCD. Modèle basé sur le paradigme de Cre-loxP. Les monomères actifs sont indiqués par une astérisque. XerD et XerC sont respectivement représentées en bleu et en vert. Les deux sites *dif* substrats à recombiner sont représentés par des doubles lignes rouges et noires. Tirée de P. Zawadzki et al. [29]

1.3 Fonction cellulaire de la machinerie Xer et implication dans le maintien de l'information génétique

1.3.1 La résolution des dimères de chromosomes

Dans leur fonction bactérienne, les recombinases XerCD ont un rôle de résolvases puisqu'elles catalysent un évènement de recombinaison en intra-moléculaire entre deux sites en orientations directes. Elles assurent ainsi une transmission verticale de l'information génétique contenue dans les chromosomes.

L'utilisation de mutants thermosensibles pour les protéines de la division cellulaire a démontré que la recombinaison Xer au site *dif* n'est réalisée qu'après l'assemblage complet du divisome [57, 58, 59]. Elle est donc régulée temporellement par rapport au cycle cellulaire bactérien. Bien que la résolution des dimères de chromosomes (CDR) ne nécessite aucune région accessoire en dehors du site *dif* lui-même, la localisation du site est importante pour la recombinaison puisque tout déplacement du site *dif* sur le chromosome (près de l'*ori* ou dans *lacZ*) conduit au même phénotype de filamentation que la délétion du site [12]. De plus l'excision de cassettes ADN contenant deux sites *dif* en répétitions directes et situées en différents *loci* a mis en évidence que la recombinaison *dif* n'apparaît que dans une région limitée du domaine Ter du chromosome. Cette région appelée DAZ pour "Dif Activity Zone" est réduite à 20kb autour du site *dif* chez *E.coli* [60, 61]. La recombinaison Xer entre deux sites *dif* est donc également régulée spatialement [62, 59, 61, 31].

Contrôle spatio-temporel par FtsK

Ce fut la découverte du rôle de la protéine FtsK dans la ségrégation du chromosome qui conduit à une meilleure compréhension de la régulation spatio-temporelle de la recombinaison *dif*. FtsK est une protéine de la division cellulaire transloquant l'ADN à travers le septum de division. Lors de la fermeture du septum de division, tout ADN chromosomique encore présent au niveau du septum suite à une mauvaise ségrégation ou la formation d'un dimère est "vu" par FtsK et transloqué de part et d'autre du septum [62, 63].

La translocation de l'ADN par FtsK est orientée vers *dif* grâce à des séquences orientées présentes sur le chromosome et appelées KOPS (*ftsK Oriented Polar Sequence*). Le rôle des séquences KOPS dans le chargement

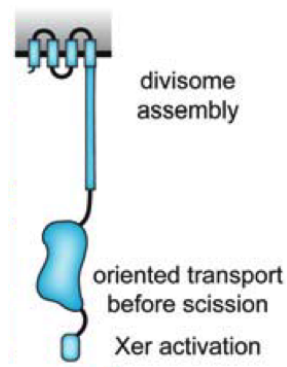


FIGURE 1.16 – **Représentation schématique de la protéine FtsK** avec les quatres hélices transmembranaires du domaines Nter, le linker et le domaine Cter constitué du moteur α - β impliqué dans la translocation de l'ADN et le domaine γ impliqué dans l'activation de la recombinaison Xer . Tiré de Midonet C. et Barre F.-X. [7]

de FtsK sur l'ADN est quant à lui encore discuté [64, 65, 66, 67, 68].

Présentation de la protéine FtsK : FtsK de *E.coli* (1329 aa) fut identifiée en 1995 lors de la recherche de mutants thermosensibles (température permissive de 20°C et non permissive de 37°C) présentant un phénotype de filamentation chez *E.coli* [69]. Dû à son implication dans la division cellulaire, la protéine FtsK (pour Filamentous Temperature Sensitive) est essentielle chez *E.coli* [70, 71, 72, 73]. La protéine FtsK est constituée d'un domaine N-terminal relié à un domaine C-terminal par un linker de longueur et séquence variable entre les différentes espèces mais riche en Glutamine et Proline [62].

Le domaine Nter, localisé au septum, présente quatre domaines transmembranaires [74]. Il interagit avec FtsZ et joue un rôle important dans la division cellulaire (voir Figure 1.16) [75, 70, 76].

Le domaine Cter, lui, est très conservé à travers le règne bactérien

[77]. Il est impliqué dans la résolution des dimères de chromosomes et la translocation de l'ADN à travers le septum au cours de la constriction [78]. Il est similaire au domaine Cter de la protéine SpoIIIE, une translocase transférant l'ADN de *B. subtilis* dans le pré-spore au cours de la sporulation [79, 80, 63, 81]. Le domaine Cter est lui même sous-divisé en deux sous-domaines α et β séparés par deux feuillets bêta et formant le moteur de translocation. Un troisième sous-domaine : le domaine γ , est impliqué dans le chargement orienté de FtsK sur l'ADN et l'activation de XerD au cours de la recombinaison spécifique de sites [82].

Les données structurales obtenues sur les Cter de protéine FtsK de *Pseudomonas aeruginosa* et *E.coli* indiquent que ce domaine est hexamérique [83, 84]. L'hexamère est constitué de 6 monomères identiques et symétriques les uns par rapport aux autres, formant un diamètre de 120 Å (voir Figure 1.17). L'héxamérisation a lieu lorsque FtsK rencontre l'ADN au moment de la fermeture du septum de division [85].

Translocation de l'ADN par FtsK :

Au centre de l'hexamère se situe un canal de 30 Å de diamètre assez large pour laisser passer de l'ADN double-brin, ce qui suggère que l'ADN est transloqué à travers l'hexamère [84, 68, 86]. La translocation est dépendante de l'hydrolyse de l'ATP, fonction portée par le sous-domaine β du moteur en Cter. L'activité ATPase est présente dans chaque sous-unité. La vitesse de translocation de FtsK est très élevée avec $\approx 12 \text{ kb/s}^{-1}$ [87]. Ce qui pose de nombreuses questions sur son mécanisme d'hydrolyse et de translocation. Actuellement deux modèles peuvent être considérés. Le premier proposé par Massey et al. en 2006 est celui de "chenille en rotation" où chaque sous-unité est active de manière séquentielle [84].

Ceci suggère un haut degré de coopérativité entre les différentes sous-

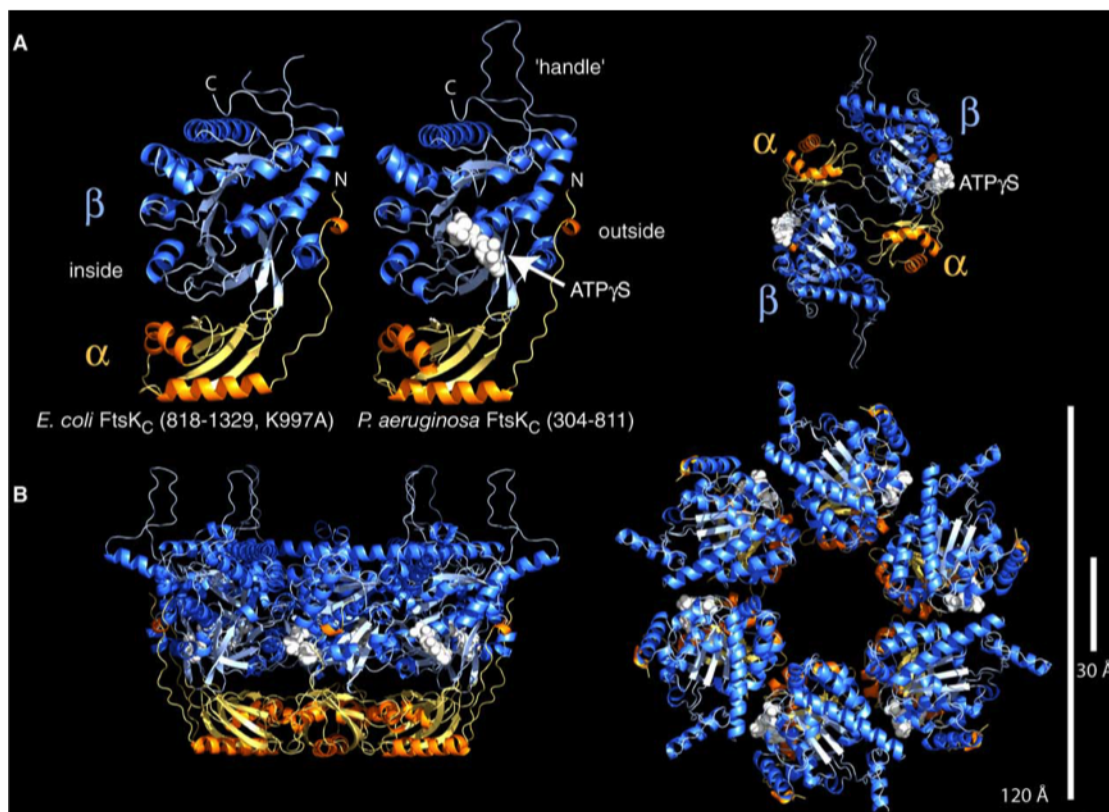


FIGURE 1.17 – **Structure cristallographique de la protéine FtsK.** (A) Structure cristalline de FtsKC de *E.coli* (gauche) et *P.aeruginosa* (au milieu). FtsKC contient deux domaines α et β . Le domaine α est spécifique de FtsK et le domaine β est relatif à RecA. A droite est représenté le dimère en têtes bêtes de deux domaines C_{ter} obtenu fréquemment au cours des cristallisations de FtsKC de *E.coli* et *P.aeruginosa* (mais sur-ement artéfactuel ou sans activité biologique). (B) Structure cristalline de l'hexamère PaFtsKCDg vu de côté (gauche) et par dessus (droite). Les six sous-unités forment un anneau de 120Å de diamètre avec un canal central de 30Å. *Tiré de Massey et al. [84]*

unités. Lors des expériences réalisées *in vitro*, Massey et al. ont mélangé dans des proportions croissantes des monomères FtsK_C sauvages de *P. aeruginosa* avec des concentrations croissantes de monomères FtsK_C mutants incapables de lier l'ATP. En mesurant l'hydrolyse de l'ATP [88], ils ont noté une décroissance exponentielle de l'activité catalytique. Il en ont

déduit que la translocation se fait par rotation et qu'il y a une activation séquentielle des différents monomères.

Cependant ce modèle fut déstabilisé par les données de E. Crozat et al. en 2010 utilisant le FtsK_C de *E.coli in vitro* [89]. Dans cette étude, ils utilisèrent des dimères ou trimères de FtsK_C au sein desquels les monomères sont reliés par un linker afin de contrôler le nombre de monomères mutants pour l'hydrolyse de l'ATP au sein de l'hexamère. Leur mesure de l'hydrolyse de l'ATP suggéra que la translocation en présence de deux sous-unités mutées possède la même vélocité que le sauvage. Ils réfutent alors le modèle de chenille en rotation et proposent le "modèle d'escorte". Ce modèle propose que lors de la translocation, une sous-unité de l'hexamère capable d'hydrolyser l'ATP et d'avancer sur l'ADN peut entraîner les autres sous-unités si elles sont mutées. Il n'y aurait pas de translocation par hydrolyse de l'ATP de manière séquentielle.

En 2015 l'équipe de Ninning L. et al. [90] proposent un modèle à l'interface des deux autres, basé sur leurs résultats obtenus avec SpoIIIE *in vitro* et utilisant des techniques de biophysique. Leurs résultats sont en faveur du modèle de chenille en rotation mais les sous-unités de l'hexamère travaillent deux par deux comme dans le modèle d'escorte. L'ADN est transloqué par deux monomères adjacents en même temps. Si l'un des deux est affecté pour l'hydrolyse de l'ATP il escorte simplement celui capable d'hydrolyse. Par contre si les deux monomères adjacents sont inactifs pour l'hydrolyse d'ATP, l'ADN ne peut être transloqué (voir Figure 1.18).

Directionnalité de la translocation de l'ADN :

La combinaison des données de génétique, bioinformatique, biochimie et molécule unique a permis d'identifier les séquences KOPS responsables de la translocation orientée de FtsK [91, 92, 64]. Ces motifs de 8pb "GG-

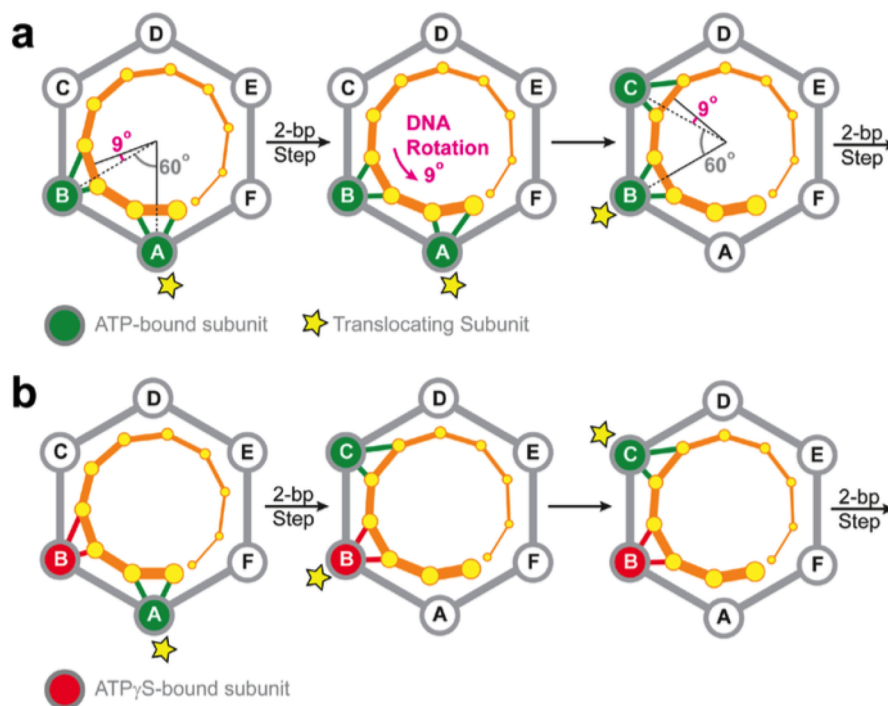


FIGURE 1.18 – **Modèle d’escorte et de rotation lors de la translocation de SpoIIIE.** (A) Diagramme schématisant la translocation et rotation de l’ADN au cours de l’avancée de SpoIIIE sur un brin d’ADN. Les unités monomériques de l’hexamère sont espacées par un angle de 60° . Les phosphates de l’ADN (représentés par des cercles jaunes) sont espacés de 34° et les contacts avec l’ADN entre deux sous-unités sont espacés de 69° . Après une translocation de 2bp une rotation de l’ADN de 9° degrés est opérée pour pouvoir aligner les prochaines sous-unités réalisant la translocation avec les phosphates de l’ADN. (B) Diagramme schématisant comment le modèle d’escorte de deux sous-unités peut outrepasser un défaut d’hydrolyse d’ATP (en rouge) dans l’une des sous-unités malgré le modèle de rotation en chenille. Un seul brin d’ADN est représenté pour plus de simplicité (orange). Les phosphates sont indiqués par des cercles jaunes. Le monomère capable d’hydrolyser l’ATP est en vert. La sous-unité exécutant la translocation est représentée par une étoile. Après avoir effectué une translocation de 2bp, une rotation est effectuée et les monomères impliqués changent. Tiré de Ninning L. et al. 2015 [90]

GNAGGG" permettent une translocation de FtsK convergeant vers *dif*. Ces motifs expliquent alors la DAZ puisque *dif* devra se retrouver à la

convergence des KOPS pour être "vu" par FtsK. Ils permettent alors un alignement des sites *dif* au milieu de la cellule : lieu de fermeture du septum où se trouve ancrée FtsK (voir Figure 1.19).

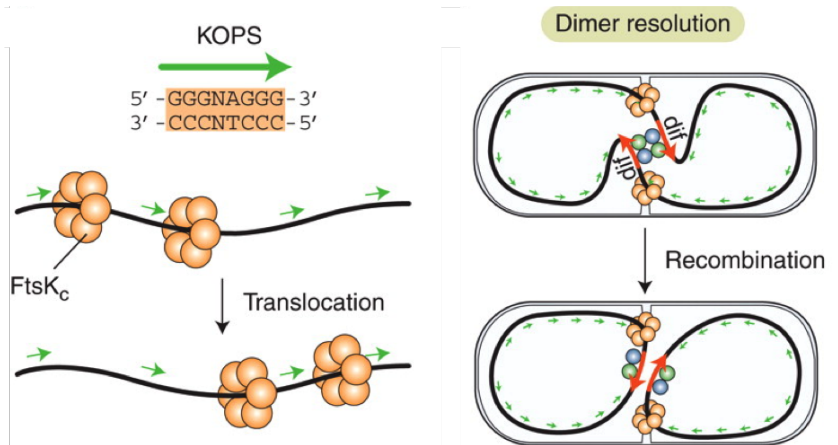


FIGURE 1.19 – Rôle des KOPS dans la régulation de la translocation de l'ADN par FtsK : gauche = effet des KOPS sur la direction du mouvement de FtsK. La séquence consensus des KOPS de *E. coli* est indiquée dans le rectangle orange. Sa directionnalité est donnée par la flèche verte. Les hexamères de FtsK_C est représenté par des sphères oranges et suivent la polarité indiquée par les KOPS et qui est représentée par des flèches vertes. droite = Rôle de FtsK dans la résolution des dimères de chromosomes. L'activité translocase de FtsK amène les deux sites *dif* d'un dimère de chromosome l'un en face de l'autre. Ils se situent alors au septum et en orientation antiparallèle, orientation propice à la formation de la synapse de recombinaison. FtsK_C interagit directement avec XerD (représenté par une sphère verte) et active la recombinaison spécifique de site. XerC est représentée par une sphère bleue. Tirée de Thanbichler M. [93]

Activation des Xer par FtsK et voie de résolution des dimères de chromosomes

Le domaine C_{ter} de FtsK fut caractérisé comme nécessaire à la CDR [62, 94]. Deux hypothèses majeures s'affrontaient cherchant à savoir si le rôle de FtsK dans la CDR reposait sur la favorisation de la formation des

synapses de recombinaison ou sur son activation. Des études utilisant du psoralène (agent pontant) et des sites *dif* en différents *loci* ont démontré que les synapses de recombinaisons se formaient entre deux sites *dif* même en dehors de la DAZ et dans un contexte FtsKC- [62]. Ils en conclurent que celles-ci peuvent se former même en l'absence de FtsK suite à la proximité des sites post-réplication. Cependant leur fréquence de formation en était fortement affectée par la rapide ségrégation des deux chromatides soeurs entre les deux cellules filles. Ces synapses donnent lieu à un échange réalisé par XerC mais la HJ en résultant est peu stable et vite révertée *in vivo* comme *in vitro* [62]; XerD étant alors inactive [44, 95, 96]. Lors de la CDR le domaine γ de l'extrême Cter de FtsK (62 aa chez *E.coli*) active la recombinase XerD pour le premier échange de brins. Les données de biologie moléculaire et structurales indiquent que γ interagit directement avec XerD au niveau du domaine Cter [97, 82, 98]. L'activité de translocation de FtsK n'est pas nécessaire à l'activation de la recombinaison et des essais de recombinaison *in vitro* ont pu être reproduits en utilisant des recombinases Xer fusionnées au domaine γ [99].

Les données *in vitro* et de molécule unique ont permis d'aller plus loin dans le mécanisme de recombinaison se réalisant au cours de la CDR. Les synapses entre deux sites *dif* se forment préalablement à l'arrivée de FtsK. Lorsque FtsK arrive au contact de celle-ci elle, est stoppée par le complexe et son domaine γ active alors XerD [100]. La conformation de la synapse est modifiée, l'échange de brin catalysé par XerD donne lieu à une HJ s'isomérisant rapidement dans une conformation favorable à un second échange catalysé par XerC. Les données de molécule unique couplant trois techniques de biophysique (PIFE, FRET, PSF) semblent indiquer que l'isomérisation du complexe fait suite à la dissociation de FtsK [87, 29]. Ces données montrant FtsK agissant sur des synapses préformées vont à l'en-

contre du modèle établi auparavant et proposant que FtsK agit sur XerD avant la formation de la synapse pour permettre la formation de "synapses pro-XerD". Si FtsK arrivait sur une synapse "pro-XerC" elle devait la "casser" à la faveur de celles faites par XerD.

1.3.2 Résolution des caténanes

La ségrégation des chromatides soeurs issues de la réplication conduit à une surtension des brins non répliqués via une accumulation de supertours positifs en amont de la fourche de réplication. Afin de permettre une bonne progression de la fourche de réplication ces tensions peuvent être relâchées par l'activité de la Topoisomérase IV et de la Gyrase. Elles peuvent également diffuser en aval de la fourche, le long des chromatides soeurs qui formeront alors des précaténanes qui correspondent à un enchevêtrement entre les deux molécules nouvellement répliquées [101]. S'ils ne sont pas résolus, ces précaténanes donnent lieu à des caténanes à l'issue de la réplication.

La TopoIV et la Gyrase appartiennent à la famille des topoisomérases de type IIA. Chez *E. coli* la TopoIV semble plus efficace pour la décaténation de l'ADN que pour relâcher le superenroulement positif et inversement pour la Gyrase. Ces deux différences fonctionnelles suggèrent que TopoIV semble agir en aval de la fourche de réplication pour résoudre les précaténanes et les caténanes, lorsque la Gyrase n'a pas pu réduire suffisamment le superenroulement positif en amont de la fourche [102, 103, 104]. De manière intéressante TopoIV semble agir préférentiellement dans la région de terminaison de la réplication [105, 103]. TopoIV possède un mécanisme de topoisomérisation, au cours duquel il y a clivage d'un double brins d'ADN. [106, 107].

La recombinaison *in vitro* sur plasmides superenroulés et contenant deux sites *loxP* en répétition directe, conduit à la formation de produits fortement caténés en présence des recombinases Cre [108]. Cependant le produit d'un tel évènement de recombinaison impliquant deux sites *dif*, la machinerie XerCD et FtsK_{50C} (Cter de FtsK avec 50aa du linker, forme de FtsK capable de translocation et d'activation de XerD) conduit à l'obtention de deux cercles libres [108]. Ces résultats suggèrent donc que la machinerie XerCD et FtsK peuvent résoudre les caténanes. Ces résultats furent confirmés par la suite par des études de recombinaison sur plasmide mais *in vivo* [109].

Le modèle :

FtsK joue un rôle clé puisqu'il agit sur deux niveaux. La translocation de FtsK déplace localement tout caténane, noeud ou superenroulement non essentiel en dehors de la synapse de recombinaison. Ensuite elle active XerD pour l'échange de brins. Il semble que le système ne soit pas capable de faire la distinction entre deux caténanes et un dimère présentant des noeuds, puisque l'environnement local des deux sites *dif* sera le même. La machinerie peut donc résoudre à la fois les monomères encaténés et les dimères "noués" [108, 109].

Le mécanisme de décaténation par FtsK et XerCD est dit "d'étapes par étapes". Une molécule d'ADN présentant un nombre "n" d'enchevêtrements va réduire étapes par étapes sont nombre d'enchevêtrements en passant alternativement par les états de monomères caténés à dimères noués et cela jusqu'à l'obtention de cercle ouverts libres (voir Figure 1.20). Les caténanes présentent un nombre paire d'enchevêtrements et les noeuds un nombre impair.

Notons que la recombinaison spécifique de site entre deux sites en orien-

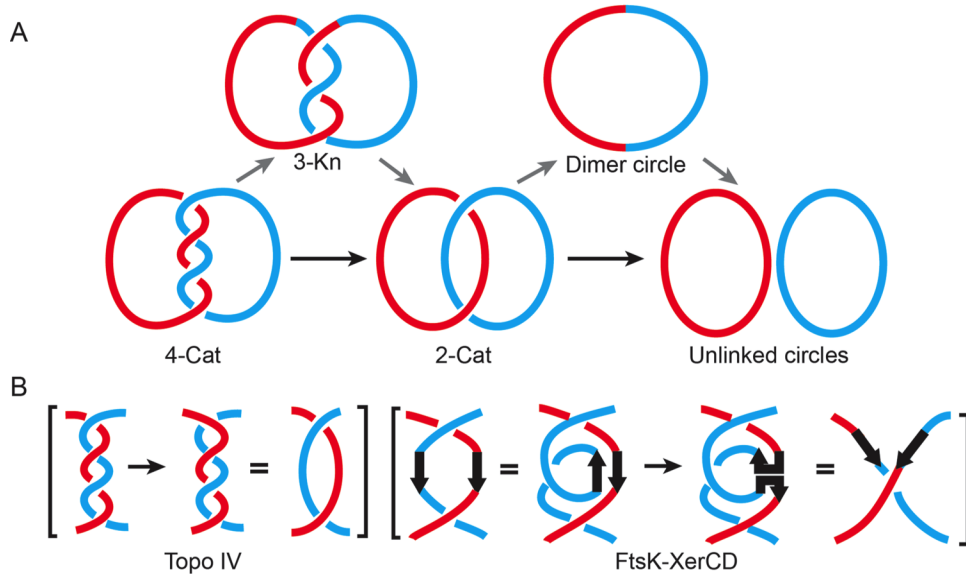


FIGURE 1.20 – Décaténation par XerCD-FtsK vs TopoIV. (A) : La décaténation chez *E.coli* est normalement réalisée par TopoIV une topoisomérase de type II. Pour un caténane de 4 enchevêtrements contenant deux sites *dif* parallèles, TopoIV résoudra le caténane en 2 étapes alors (voie du bas) en réalisant deux crossings à chaque étape. XerCD-FtsK résoudra ce même caténane en 4 étapes (voie en zig-zag) en réalisant un crossing à chaque étape. (B) : Les mécanismes de simplification de la topologie pour TopoIV et FtsK-XerCD sont illustrés. Tiré de M. Jayaram et al. [25]

tations antiparallèles ne crée pas de modification du superenroulement excepté en cas de recombinaison entre deux sites au cours d'une réaction d'inversion (sites en répétition indirecte). En effet des essais sur Cre, Flp et λ Int ont démontré une modification locale du superenroulement lors des recombinaisons d'inversions qui serait dû au piégeage d'un "crossing" simple dans le complexe de recombinaison [110, 108, 41, 111]. Les deux produits obtenus à partir d'une telle réaction ont différentes topologies avec respectivement un superenroulement de -2 et +2.

1.4 Détournement de la machinerie Xer par les éléments génétiques mobiles et implication dans le transfert horizontal de gènes

1.4.1 Résolution des dimères de plasmides

De manière identique aux chromosomes circulaires, la recombinaison homologue peut conduire à la multimérisation des plasmides et autres ADN circulaires en cas de nombre impair de crossing-over entre les deux brins néo-répliqués. La formation du multimère impacte tous les plasmides à faible nombre de copies puisque ceux-ci interfèrent avec le système de partition et donc compromet la transmission verticale du plasmide. Elle impacte également les plasmides à haut nombre de copies car un dimère a deux fois plus de chance de se répliquer et les formes multimériques finissent donc par être accumulées au sein de la cellule. Beaucoup de plasmides et phages possèdent alors leur propre machinerie de recombinaison spécifique de site pour résoudre ces multimères tels que le phage P1 avec les recombinases Cre [112], ou la recombinase Mrpa du plasmide SCP2 présent chez *Streptomyces coelicolor* [113]. La plupart du temps ces recombinases sont similaires à des résolvases ou intégrases. Cependant certains plasmides ne possèdent pas leur propre machinerie de résolution des multimères de plasmides (PMR) et piratent la machinerie XerCD.

Historiquement, c'est l'étude du plasmide ColE1 présent chez *E.coli* qui permis de découvrir le gène *xerC* lors d'un crible génétique visant à identifier la recombinase utilisée par ColE1 [19] pour la PMR. Par la suite ce sont surtout les études portées sur ColE1 et pSC101 qui déverrouillèrent notre compréhension sur ce système.

Les plasmides pSC101 et ColE1 possèdent un site de recombinaison d'environ 150-180bp nommés *psi* et *cer* respectivement [114, 115, 33, 19, 116]. Ces sites contiennent un site coeur similaire à *dif* car possédant les séquences de fixation pour XerC et XerD mais dont les régions centrales diffèrent du site *dif* de la bactérie hôte (une région centrale équivalente conduirait à l'intégration du plasmide dans le chromosome bactérien). En plus de ce site coeur, à environ une centaine de paires de bases se trouvent des séquences accessoires, sites de fixation des facteurs cellulaires PepA et ArgR (pour *cer*) et PepA et la forme phosphorylée de ArcA (pour *psi*) [115, 117, 118]. PepA est une aminopeptidase et protéine de liaison à l'ADN alors que ArgR et ArcA sont des régulateurs transcriptionnels [118, 119] (voir Figure 1.21A).

PepA, ArgR et ArcA créent un filtre topologique

De manière étonnante la recombinaison XerCD semble sensible à la topologie puisque pour les sites *cer* et *psi* elle résout les multimères en monomères mais ne crée pas de nouveaux multimères. Pour la plupart des recombinases à Tyrosines, des superenroulements peuvent être piégés lors de la réaction de recombinaison et donner lieu à des produits présentant une grande variabilité de topologie. On parle de collision aléatoire (voir exemple de Int. Figure 1.21B). Dans le cas de *psi*, le produit obtenu présente toujours la même topologie : deux plasmides caténés avec quatre enchevêtrements. La PMR est donc contrainte par un filtre topologique. Pour *cer* ce filtre topologique existe également mais la recombinaison est bloquée à l'étape de la Jonction de Holliday (voir ci-après).

Nous avons vu dans la partie traitant de FtsK, que la translocation de l'ADN par cette dernière permet de déplacer localement les superenroule-

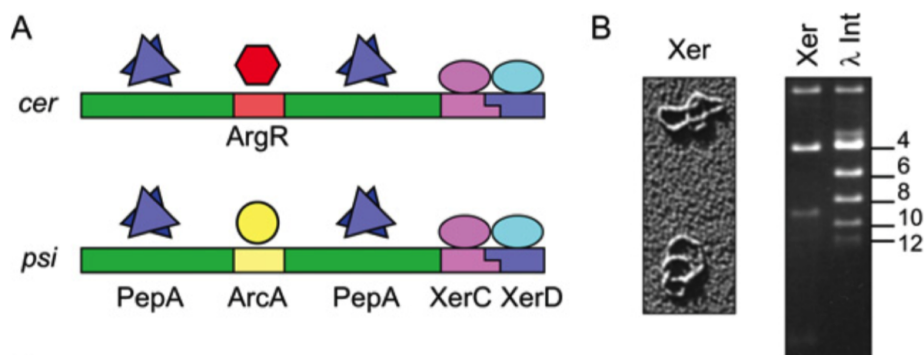


FIGURE 1.21 – Sites *cer* et *psi* et topologie du produit de recombinaison. (A) : Représentation schématique des sites *cer* et *psi* indiquant de manière qualitative les positions des sites de fixations des protéines accessoires PepA, ArgR et ArcA par rapport à XerC et XerD. (B) : La recombinaison Xer à *psi* donne un produit "right-handed" caténé de 4 enchevêtrements. Gauche = observation au microscope électronique après traitement à la DNaseI pour retirer le supercoiling. Droite = gel d'électrophorèse montrant un ADN circulaire contenant des sites *attP* en répétition directe et recombiné par Int. du phage λ versus une molécule circulaire contenant deux sites *psi* en répétition directe et recombines par XerCD, PepA et ArcA. On observe une échelle de différents enchevêtrements dans le cas de λ alors qu'avec *psi* le produit est toujours un caténane à 4 enchevêtrements. Tiré de Colloms S. D. 2013 [120]

ments inutiles et résoudre des caténanes de plasmides via XerCD. Cependant dans le cas de la PMR FtsK n'intervient pas. Le filtre topologique est le résultat de la fixation de protéines accessoires PepA, ArgR ou ArcA sur les sites *cer* et *psi* [121]. Ces observations sont notamment soutenues par les expériences réalisées *in vitro* utilisant des fusions *loxP-psi* sur lesquelles la recombinaison Cre est testée en présence de PepA [42]. Alors que la recombinaison Cre se fait normalement par collision aléatoire (comme λ), dans ces conditions, les produits obtenus présentent une topologie de deux caténanes avec quatre enchevêtrements. Ces résultats suggèrent également que PepA joue un rôle majeur dans l'établissement du filtre topologique puisque ArcA phosphorylée est absente de ces réactions de recombinaison.

Le modèle basé sur les prédictions mathématiques de l'analyse de l'enchevêtrement [122] et les résultats des structures de PepA aux rayons X [123, 124] est le suivant : La raison pour laquelle le produit de recombinaison n'est obtenu que pour des sites présents sur la même molécule d'ADN en orientation directe et que le produit de recombinaison possède toujours la même topologie consistant en deux caténanes avec quatre enchevêtrements, est que la synapse de recombinaison est toujours la même grâce au filtre topologique. Cette synapse ne peut être formée que dans le cas de sites en orientations directes. Pour être formée correctement l'ADN des sites de recombinaisons doit être enroulé un certain nombre de fois autour des protéines accessoires PepA et ArgR ou ArcA. Le tout au sein d'un plectonème où l'ADN superenroulé négativement est dit "right-handed" (voir Figure 1.22).

Plus précisément ce filtre implique trois tours d'ADN autour de deux hexamères de PepA et un hexamère de ArcA phosphorylés ou ArgR (voir Figure 1.23).

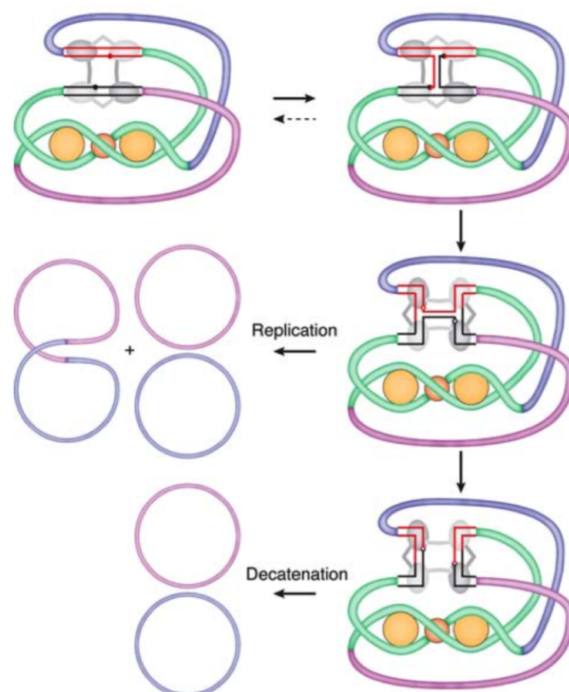


FIGURE 1.22 – **Le filtre topologique contrôle la catalyse de Xer pour la résolution des dimères de plasmides** : Représentation schématique du filtre topologique exercé par PepA (P) et ArgR ou ArcA (A) lors de la PMR. Les cercles oranges représentent les protéines accessoires. Les traits verts représentent les séquences accessoires. En violet et en rose sont représentés les deux monomères plasmidiques. Dans le cas de *cer* (milieu) la réaction est bloquée à la HJ. Dans le cas de *psi* (bas) un double échange de brins est réalisé. Tiré de Midonet C. et Barre F.-X. [7]

Échanges de brins au cours de la résolution des dimères de plasmides

Dans cette conformation de synapse, la recombinase XerC est active et réalise le premier échange de brins donnant lieu à l'intermédiaire de recombinaison qu'est la HJ [33, 14]. Pour *cer*, XerD ne peut pas résoudre cette HJ en produit [34]. Le passage de la fourche de réplication résoudra partiellement ce dimère, donnant lieu à un produit monomérique et un produit dimérique (voir Figure 1.22). Dans le cas des sites *psi*, la HJ sera

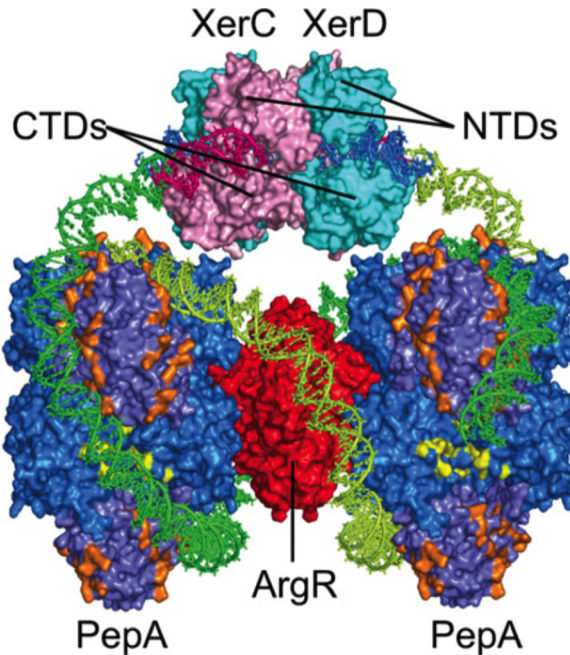


FIGURE 1.23 – **Modèle du filtre topologique exercé par PepA et ArgR sur un site *cer*.** Les séquences accessoires de *cer* sont enroulées autour de deux hexamères de PepA (bleu) et un hexamère de ArgR (rouge). Le tétramère de XerCD (rose et cyan respectivement) a été représenté selon la structure cristallographique existante pour Cre. Les sites de fixation de XerC et XerD sont représentés en rose et bleu respectivement. CTD : domaine C-terminal. NTD : domaine N-terminale. En orange et jaune sont représentées les mutations dans PepA qui affectent l'activation de la recombinaison Xer pour la PMR, selon si elle sont dans le domaine Nter ou dans la région putative de fixation à l'ADN. Tiré de Colloms S.D. 2013 [120]

résolue en produit par un second échange de brins réalisé par XerD. Le fait que les sites *psi* soient capables d'activer XerD laisse présumer que la synapse diffère donc légèrement de celle de *cer*. De manière intéressante l'inversion des sites *psi* donne lieu à une recombinaison initiée par XerD et dont le second échange de brins est réalisé par XerC [125]. Ceci suggère que des contraintes topologiques peuvent changer l'ordre d'échange des brins en déterminant quelle recombinaison sera active dans la synapse.

1.4.2 Les IMEXs (Integrative Mobile Element using Xer)

Introduction des IMEXs

Les génomes de la plupart des éléments mobiles intégratifs tels que les phages lysogéniques, les transposons ou les îlots génétiques, codent pour leur propre intégrase. Cette enzyme (souvent une recombinase à Tyrosine) catalyse un échange de brins par recombinaison entre deux sites ADN pour fusionner le génome de l'élément mobile à celui de l'hôte dans la cas de l'intégration et inversement dans le cas d'une excision. Souvent l'enzyme permettant l'intégration est la même que celle réalisant la recombinaison d'excision, mais les complexes synaptiques mis en jeu diffèrent. Dans le cas de l'intégrase Int. du phage λ par exemple, la synapse utilisée pour l'intégration utilise le facteur de l'hôte IHF, un hétérodimère liant l'ADN et ayant un rôle architectural dans la synapse de recombinaison en se fixant sur des sites accessoires présents sur le phage [126, 127]. Dans la cas de l'excision ; elle utilise IHF, Fis et Xis un facteur phagique [128, 129]. Ces protéines se lient également sur les sites accessoires présents sur le phage, et la synapse de recombinaison formée est architecturalement différente de celle utilisée pour l'intégration. Le fait d'encoder pour sa propre recombinase et de dépendre de facteurs différents pour l'intégration et l'excision permet donc de réguler la forme lysogénique et la stabilité de l'élément dans le génome de l'hôte.

Cependant certains éléments génétiques mobiles intégratifs trouvés chez les bactéries ne possèdent pas leur propre intégrase. Pour intégrer leur génome dans celui de l'hôte ils utilisent la machinerie Xer bactérienne. On parle d'IMEX (pour Integrative Mobile Element using Xer). Pour ce faire, ils possèdent dans leur génome une séquence nucléotidique d'attachement

(*attP*) similaire au site *dif* (*attB*). Celui-ci est reconnu par les recombinases Xer qui catalysent alors une réaction de recombinaison en intermoléculaire entre le site *dif* et le site *attP*. Dans cette fonction XerC et XerD jouent donc un rôle d'intégrases et catalysent la réaction opposée à leur rôle biologique ; à savoir fusionner deux molécules au lieu de les séparer. Lors de ce processus deux sites recombinés sont créés : *attL* et *attR* pour site gauche (Left) et site droit respectivement (Right) (voir Figure 1.24). Le site *attL* est constitué du site de fixation de XerD anciennement sur *attP* ainsi que les 3 pb de la région centrale adjacente, et l'autre moitié du site *dif* initial contenant le bras de fixation de XerC. Le site *attR*, lui, est formé de la moitié du site *dif* contenant le site de fixation de XerD et l'autre moitié de *attP* pourvue du site de fixation de XerC (voir Figure 1.24). Dans le cas des IMEXs, le site *attR* devient le nouveau site *dif* utilisé par la souche pour la CDR. Il peut toujours être la cible d'autres IMEXs et permettre de multiples évènements d'intégrations successifs. Il est alors possible de retracer l'ordre d'arrivée des IMEXs dans une souche bactérienne en partant du postula que seules les intégrations entre un site *attP* et un site *dif* (ou nouveau site *dif*) sont possibles. L'IMEX le plus éloigné du site *dif* est le plus anciennement intégré.

Lors d'un évènement d'excision, les sites *attL* et *attR* recombinent et redonnent les sites initiaux *attP* et *dif*. Notons qu'en cas de multiples évènements d'intégrations, l'excision reforme le site *dif* initial mais le site *attP* est un hybride de deux sites *attP* (voir Figure 1.24).

Les IMEXs peuvent être classés en plusieurs catégories selon leur site *attP* et leurs différentes stratégies de détournement de la machinerie Xer. Le modèle bactérien *V.cholerae* présente l'avantage d'être ciblé par au moins trois des quatre catégories d'IMEXs découvertes à ce jour.

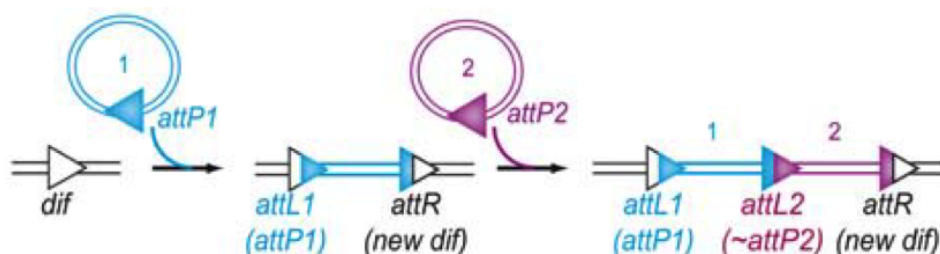


FIGURE 1.24 – **Intégrations successives des IMEXs dans un site *dif*.** Les triangles indiquent les sites de recombinaison *attP*, *dif* ou *attL* et *attR* après intégration. Les sites sont orientés comme suivant : le site de fixation de XerC est du côté du bord large du triangle et le triangle pointe vers le site de fixation de XerD. Tirée de Midonet C. et Barre F.-X. [7].

Les IMEXs type CTX ϕ

Historiquement les IMEXs furent découverts avec l'étude du phage filamentueux CTX ϕ (Cholera Toxin Phage), dont le génome code pour la toxine cholérique; l'un des deux facteurs majeurs de pathogénicité de *V. cholerae*. En 2002, Kathryn E. Huber et Matthew K. Waldor remarquèrent que le prophage CTX ϕ est intégré à proximité du site *dif* et qu'une version CTX-Kn du phage n'est plus capable de s'intégrer dans des mutants délétés en XerC ou XerD [130]. Cependant le mécanisme d'intégration restait peu clair étant donné qu'aucun site présent sur le phage ne semblait remplir les conditions pour être capable de recombiner avec le site *dif* de l'hôte. Deux sites putatifs étaient présents dans le génome de CTX ϕ . Le premier *attP1* ne possède pas suffisamment d'homologies dans la région centrale par rapport au site *dif* cible pour permettre une stabilisation au cours de "l'envahissement de brins" post-clivage. Le second, *attP2*, possède une région centrale supérieure à 8bp, ce qui devrait empêcher les interactions cycliques nécessaires entre les recombinases dans la synapse de recombinaison (voir Figure 1.26 A et B).

La recombinaison des cassettes des intégrons inspire la découverte du mécanisme d'intégration de CTX ϕ :

C'est en 2005 que le mécanisme d'intégration concernant la formation du site de recombinaison dans le cas de CTX ϕ et des autres IMEXs appartenant à la même famille est élucidé. Cette découverte fut possible grâce aux travaux réalisés sur les intégrons. Les cassettes d'intégrons sont des modules génétiques mobiles constitués de petites cassettes d'ADN contenant une ORF sans promoteur et un site de recombinaison *attC*. Ces cassettes s'insèrent dans la plateforme de l'intégron composée d'un gène codant pour une intégrase, d'un site *attI* et de deux promoteurs en orientations opposées, l'un pour la transcription de l'intégrase et l'autre dirigée vers *attI* (voir Figure 1.25). L'intégrase appartient à la famille des recombinases à Tyrosine. Elle catalyse l'insertion des modules contenant un site *attC* dans le site *attI* (pour revue plus détaillée sur les intégrons voir [131]).

Des premiers résultats réalisés *in vitro* avaient démontré que l'intégrase IntI de l'intégron se fixait mieux sur le simple brin "bottom" contenant un site *attC* que sur un site *attC* double brin, et laissaient supposer un rôle important dans la formation de structures secondaires au niveau du site *attC* [132, 133]. En 2005 *M. Bouvier et al.* [134] démontrent alors par une approche génétique délivrant par conjugaison le brin "bottom" ou "up" dans une cellule receveuse, que la forme simple brin du brin "bottom" est la forme intégrative utilisée par les cassettes *attC*. L'ADN impliqué est replié en une structure secondaire de type épingle à cheveux pour former localement un site double brins utilisé par la recombinase lors de la recombinaison *attI/attC*. Le site d'intégration *attI* reconnu par IntI est lui sous forme double brin dans le génome.

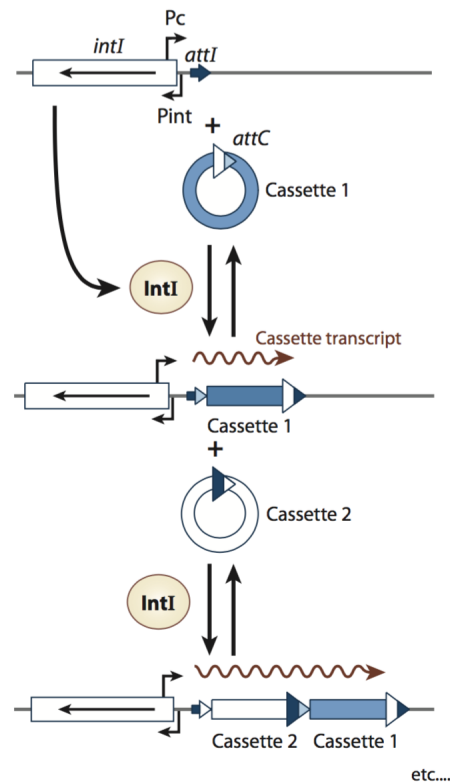


FIGURE 1.25 – Capture de gènes par les intégrons et modèle d’intégration d’une cassette portant un site *attC* : Aperçu du processus par lequel les cassettes de gènes circulaires sont régulièrement insérées au site *attI* dans un intégron et en aval du promoteur fort *Pc*. *intI* : gène codant l’intégrase. *Tirée de G. Cambray et al. [131]*.

Mécanisme d’intégration de $CTX\phi$:

Basé sur les études réalisées sur les intégrons et en parallèle de ce travail M.-E. Val et al. [135] déterminent alors que dans le cas des IMEXs de types $CTX\phi$, la forme intégrative utilisée par le phage est l’ADN simple brin positif ; forme empaquetée dans les particules phagiques [135]. Un repliement en structure en épingle à cheveux permet la formation d’un site $attP^{CTX}$ viable pour la recombinaison à partir de *attP1* et *attP2* (voir Figure 1.26 C).

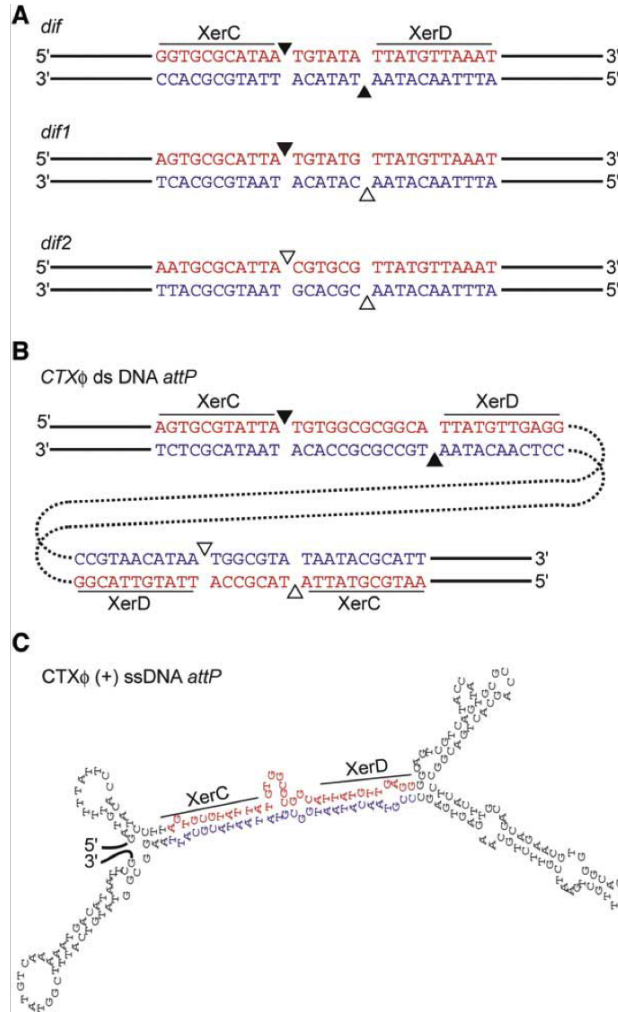


FIGURE 1.26 – Le repliement en épingle à cheveux de l’ADN simple brin de CTX forme un site $attP^{CTX}$ fonctionnel et utilisé pour l’intégration via XerCD. Les sites de fixations des Xer sont indiqués par une ligne et les sites de clivages de XerC et XerD sont représentés par des triangles. Un triangle plein indique un site de clivage testé expérimentalement alors qu’un site de clivage putatif est représenté par un triangle vide. Les brins clivés par XerC et XerD sont respectivement en rouges et bleus. (A) : Comparaison des sites *dif*_{*E.coli*}, *dif1*_{*V.cholerae*} et *dif2*_{*V.cholerae*} respectivement sur les chromosomes 1 et 2 de *V.cholerae*. (B) : Séquence de l’ADN double brins autour du site $attP^{CTX}$ représentant les deux sites *attP1* et *attP2*. (C) : Structure en épingle à cheveux de l’ADN simple brin positif de CTX ϕ et formation du site $attP^{CTX}$ utilisé pour l’intégration. Tirée de Val M.-E. et al 2005 [135]

Les IMEXs de type $CTX\phi$ sont donc caractérisés par un site d'attachement *attP* formé lors du repliement en structure en épingle à cheveux de l'ADN du brin positif de leur génome. Une seconde caractéristique se situe au niveau de la région centrale de ces derniers. La région centrale contient une boucle de bases non appariées, de taille variable et dont le rôle dans le processus de recombinaison reste indéterminé. De plus, la région centrale n'est que partiellement homologue au site *dif* cible même au sein de ce site. La région centrale n'est conservée que du côté du site de fixation de XerC (voir Figure 1.27). On trouvera dans cette catégorie d'IMEXs, le phage Yfp ϕ présent chez *Yersinia pestis* ou CUS-1 ϕ chez *E.coli* [136, 137].

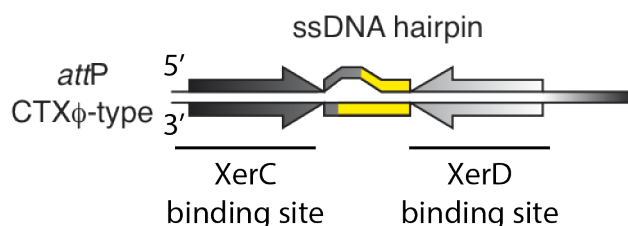


FIGURE 1.27 – **Représentation schématique des sites *attP* de type $CTX\phi$.** Le site *attP* utilisé pour la recombinaison est formé par le repliement local en épingle à cheveux de l'ADN simple brin positif du génome. Les flèches grises représentent les sites de fixation pour XerC et XerD en gris foncé et gris clair respectivement. Le dégradé donne l'orientation du site. Les sections en jaune indiquent l'absence d'homologie avec le site *dif* cible, dans la région centrale. Les parties en gris sont celles identiques au site *dif* cible.

La recombinaison Xer effectuée entre un site *attP* de type $CTX\phi$ et un site *dif* est initiée par un échange de brins catalysé par XerC et donnant lieu à une jonction de Holliday [138] (voir Figure 1.28). Un second échange catalysé par XerD ne peut être productif et conduirait à la mort cellulaire bactérienne puisqu'un double échange de brin entre un chromosome circulaire double brin et un ADN circulaire simple brin ouvrirait le chromosome.

Dans le cas de ces IMEXs et basé sur les connaissances concernant les intégrons, il est supposé que c'est la fourche de réplication qui converti cette jonction d'Holliday en un produit correspondant au prophage intégré d'une part et le substrat initial d'autre part (voir Figure 1.28).

Les jonctions de Holliday formées par XerC sont hautement réversibles et instables chez *E.coli* mais également chez *V.cholerae* et ne sont observées *in vivo* qu'en présence d'un agent intercalant ou *in vitro* en présence de fortes concentration de glycérol. Il est donc présumé qu'un tel mécanisme de recombinaison devrait être défavorable à l'intégration du phage. Cependant des données récentes suggèrent qu'un facteur cellulaire, l'endonucléase EndoIII, est capable de reconnaître les structures branchées de type HJ et d'occuper le site [139]. Il est donc possible qu'EndoIII empêche la réversion de la HJ en la stabilisant jusqu'au passage de la fourche de réplication, pour permettre l'intégration de CTX ϕ . Cependant aucune donnée ne laisse supposer que le rôle d'EndoIII dans l'intégration est étendu à tous les IMEXs de type CTX ϕ .

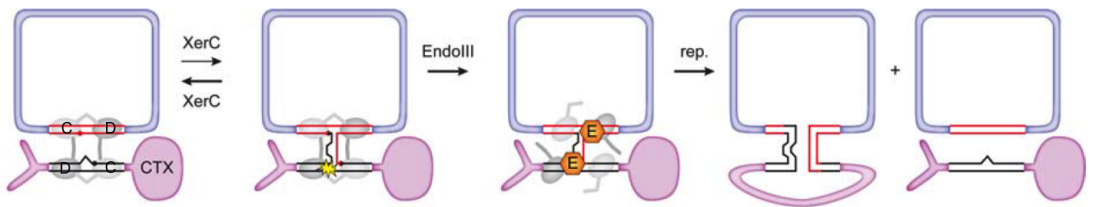


FIGURE 1.28 – **Voie d'intégration des IMEXs de type CTX ϕ .** L'ADN simple brin et double brins de l'IMEXs est représentée en rose. L'ADN circulaire double brin du chromosome de l'hôte est représenté en violet. Les recombinases XerC et XerD sont représentées par des sphères grises claires et grises foncées respectivement, la recombinaise active donnant son Cter en *cis*. L'incapacité pour XerD de donner un échange de brins productif suite au manque d'homologie dans la région centrale est représentée par une étoile jaune. Les hexagones oranges marqués d'un E représentent EndoIII. *Tirée de Midonet C. et Barre F.-X.[7]*

L'excision de CTX ϕ est-elle possible ? :

Après passage de la fourche de réplication l'ADN simple brin du phage utilisé comme forme intégrative est converti en ADN double brins, masquant le site d'attachement fonctionnel pour la recombinaison en sites *attP1* et *attP2* [138]. L'excision de CTX ϕ paraît donc irréversible mais la production de particules phagiques reste possible dans le cas de multiples événements d'intégrations. En effet la réplication en cercle roulant peut être initiée sur une première copie et se terminer au niveau d'une seconde copie intégrée juste après ; produisant des formes extrachromosomales. Dans le cas des intégrons, il a été démontré que l'excision par recombinaison entre deux sites *attC* est possible [140]. Au cours de ce processus, les ADN simples brins des sites *attC* recombinant forment une structure en épingle à cheveux. L'intégrase se fixe sur les sites *attC*, et forme une synapse stable au sein de laquelle l'échange de brins a lieu [141, 142]. Cependant tous les sites *attC* ne s'excisent pas avec la même efficacité et il semble que les bases extra-hélicales présentes dans la structure en tige soient importantes [143]. L'excision de CTX est donc théoriquement possible mais n'a pas pu être observée en conditions de laboratoire jusqu'à présent.

Les IMEXs de type VGJ Φ

À ce jour, les IMEXs de type VGJ ϕ , tels que les phages filamenteux VEJ ϕ , fs2 ϕ ou VSK ϕ ont principalement été découverts chez les *Vibrionaceae*. Ils s'intègrent au site *dif* par un mécanisme légèrement différent de celui de CTX ϕ [144, 145, 146]. Leur site *attP* est formé par l'ADN double brin de l'IMEX. On retrouve le site de fixation pour XerC et XerD mais la région centrale faisant 7pb au lieu de 6pb, n'est pas conservée au pied du site de fixation de XerD par rapport au site *dif* cible (voir Figure 1.29). Là encore, comme dans le cas de CTX ϕ , un échange de brin catalysé par

XerD n'est théoriquement pas productif.

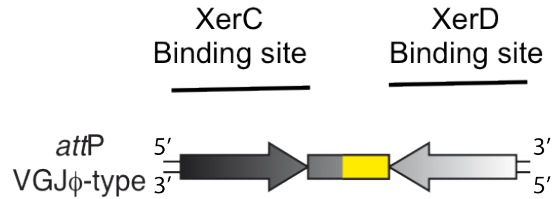


FIGURE 1.29 – **Représentation schématique du site d'attache des IMEXs de type VGJ ϕ .** Les flèches grises représentent les sites de fixation pour XerC et XerD en gris foncé et gris clair respectivement. Le dégradé donne l'orientation du site. Les sections en jaune indiquent l'absence d'homologie avec le site *dif* cible, dans la région centrale. Les parties en gris sont celles identiques au site *dif* cible.

Lors des événements d'intégrations des IMEXs de type VGJ ϕ le premier échange de brins est initié par la catalyse de XerC et donne lieu à une HJ [145] (voir Figure 1.30). Basé sur l'absence d'homologie dans la région centrale au pied de XerD et sur le fait qu'aucune activité de résolution par XerD n'a été observée *in vitro* alors que VGJ s'intègre au chromosome *in vivo*; tout comme dans le cas de CTX ϕ il est fortement présumé que la réplication résout la HJ en produits (voir Figure 1.30). L'un des produits correspond au prophage et le second est équivalent aux substrats de la réaction. Contrairement aux IMEXs de type CTX ϕ après intégration le site $attP^{VGJ}$ peut toujours être reconnu par les recombinases Xer. Le mécanisme d'excision est le même que celui d'intégration et seulement une cellule fille sur deux issues de la réplication excisera VGJ ϕ .

Les IMEXs de type TLC Φ

TLC fut initialement décrit par Rubin *E. J.* et al [147] comme étant un plasmide cryptique présent en faible nombre de copies. En plus de la

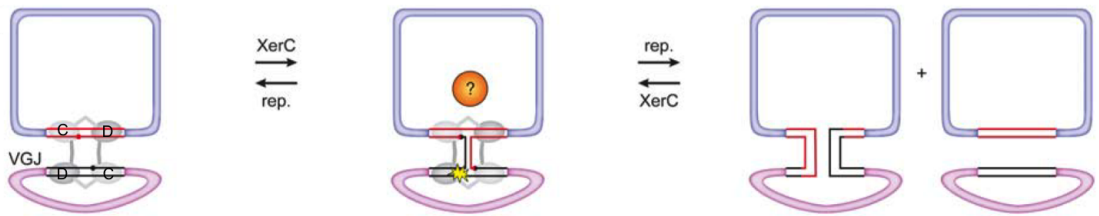


FIGURE 1.30 – **Voie d'intégration des IMEXs de type VGJ ϕ .** l'ADN double brins de l'IMEX est représenté en rose. L'ADN circulaire double brins du chromosome de l'hôte est représenté en violet. Les recombinaisons XerC et XerD sont représentées par des sphères grises claires et grises foncées respectivement, la recombinaison active donnant son Cter en *cis*. L'incapacité pour XerD de donner un échange de brins productif suite au manque d'homologie dans la région centrale est représentée par une étoile jaune. Le cercle orange marqué d'un point d'interrogation indique l'intervention éventuelle d'un facteur supplémentaire. *Tirée de Midonet C. et Barre F.-X.[7]*

forme cytoplasmique, plusieurs copies de TLC sont intégrées en tandem au chromosome, à proximité du site *dif1*. Ce n'est que plus tard que TLC fut considéré comme étant un phage satellite intégratif utilisant les protéines de capsides de fs2 ϕ ou VGJ ϕ ([148] et données non publiées). En 2010 TLC fut considéré comme un IMEX puis d'autres éléments mobiles possédant un site similaire furent identifiés [136].

Les IMEXs de types TLC ϕ possèdent un site d'attachement *attP* présent sur le génome double brins de l'élément. Contrairement aux IMEXs de type CTX ϕ ou VGJ ϕ la région centrale du site de recombinaison est totalement identique à celle du site *dif* cible (voir Figure 1.31).

Un échange de brins catalysé par XerD comme XerC peut donc être productif et chacune des recombinaisons est susceptible d'initier le premier échange de brins pour donner une HJ. Cependant ces sites présentent comme caractéristique d'avoir un site de fixation pour XerD dégénéré par

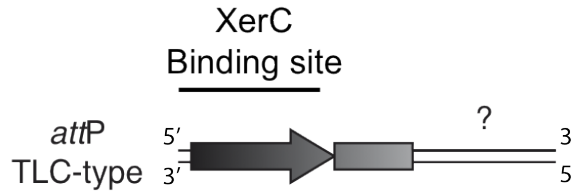


FIGURE 1.31 – **Représentation schématique du site d’attachement des IMEXs de type TLC ϕ .** La flèche grise foncée représente le site de fixation pour XerC. Le site de fixation XerD semble manquer et est indiqué par un point d’interrogation. La région centrale est représentée par un rectangle gris, et ne présente pas de partie jaune car complètement homologue à celle du site *dif* cible.

rapport à la séquence consensus des sites *dif*. Dans le cas de TLC ϕ seules 3pb sur les 11pb de fixation de XerD sont conservées par rapport au site *dif* cible. Ces sites semblent donc théoriquement affectés pour la fixation de XerD ce qui devrait être délétère pour la formation de la synapse de recombinaison. On trouvera dans cette catégorie un certain nombre d’IMEXs ciblant des *Xanthomonadales*, et les *Vibrionales* [136].

Au commencement de ma thèse le mécanisme de recombinaison des éléments de type TLC ϕ était inconnu. Je me suis basée sur l’étude du mécanisme d’intégration et excision du phage TLC chez *V. cholerae* comme paradigme de cette classe d’IMEXs. Le phage satellite TLC que nous avons décidé d’étudier est celui décrit par Hassan et al. en 2010 [148]. Il possède un génome circulaire de 5363bp, contenant 7 cadres de lectures ouverts (ORF : Open Reading Frame) (voir Figure 1.32).

Parmi ces ORFs on trouvera le gène *cri* codant pour la nickase permettant l’initiation de la réplication de l’ADN par le mécanisme de cercle roulant. Basé sur sa position juste derrière *cri* et dans la même orientation se trouve VC1468 qui coderait pour la putative protéine de liaison à l’ADN

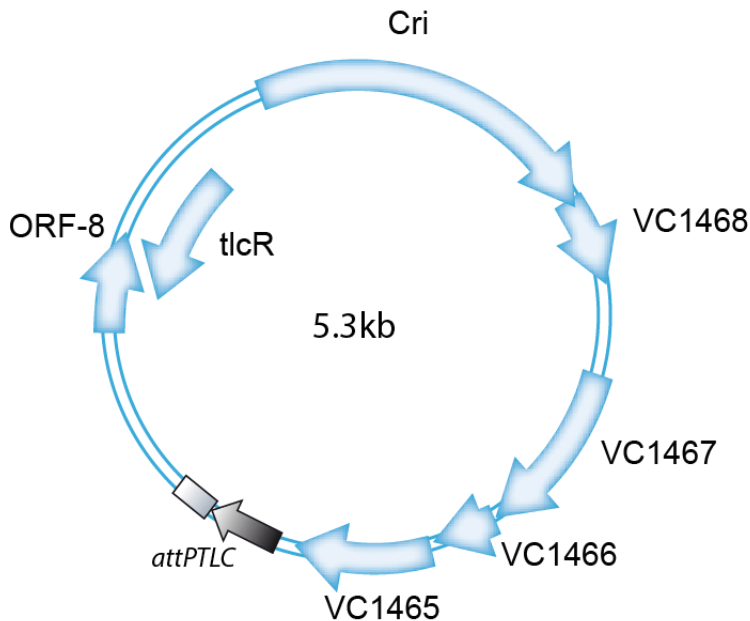


FIGURE 1.32 – **Représentation schématique du génome du phage satellite TLCφ.** Les flèches indiquent de manière qualitative la position et l'orientation des ORFs. Le site *attPTLC* est représenté comme figure 1.31. Les deux lignes circulaires bleues représentent l'ADN double brins. Le génome de TLC utilisé pour cette représentation est celui décrit par Hassan et al. en 2010 [148].

simple brin (SSB : single-strand binding protein). De même, de part son orientation en sens inverse et sa position en amont de *cri*, l'ORF *tlcR* a été nommée ainsi car serait le gène codant pour le répresseur de *cri*. On notera les ORF VC1465, VC1466 et VC1467 prédites comme codant pour des putatives protéines de liaison à l'ADN. Enfin il semblerait qu'il y ait une région intergénique d'environ 1kb entre le site *attPTLC* et *tlcR*. De manière intéressante une étude d'analyse de "RNA sequencing" de souches de *V.cholerae* a détecté dans cette région un ARN non codant pour une protéine (ncpRNA : non-coding protein RNA) [149].

1.5 Enjeux de la thèse

Comme déjà énoncé ci-dessus, la séquence de fixation pour XerD dans le site *attPTLC* est fortement dégénérée avec seulement 3 pb sur les 11 pb correspondantes au site de fixation de XerD sur les sites chromosomiques *dif* de *V.cholerae* (voir section Résultats partie I : Papier). Cet aspect soulève de nombreuses questions car cela devrait être délétère pour la formation de la synapse de recombinaison nécessaire à l'intégration du phage. Or le phage est toujours capable d'intégration dans un site *dif* [148]. De plus tous les éléments mobiles piratant la machinerie Xer et étudiés à ce jour utilisent une voie de recombinaison nécessitant un premier échange de brins réalisé par XerC. Dans le cas des IMEXs de type VGJ ou CTX, XerD ne peut théoriquement pas faire un échange de brins productif puisque la région centrale n'est pas conservée par rapport au site *dif* cible et ne permet pas de stabilisation par des interactions de type Watson-Crick ou Wooble après invasion du brin opposé. De plus XerD requiert d'être activé par FtsK. Utiliser une voie de recombinaison nécessitant l'activation par FtsK restreindrait temporellement l'intégration au moment de la constriction du septum de division, moment où FtsK "voit" l'ADN. Cependant dans le cas des IMEXs de type TLC une telle prédiction ne peut être faite puisque la région centrale est identique à celle du site *dif* cible. Un processus de recombinaison contrôlé par FtsK serait également délétaire pour la stabilité de l'IMEX.

Nous avons montré au cours de l'introduction que l'activité des recombinases XerC et XerD est finement régulée, d'un point de vue spatial et temporel, mais également via des interactions allostériques entre elles ou par la séquence ADN du site de recombinaison lui même. Les IMEXs sont des éléments mobiles capables de détourner la machinerie XerCD et

d'outrepasser ce contrôle. Étudier les différents mécanismes et différentes stratégies utilisées par les IMEXs nous permettra de mieux comprendre les lois régissant le contrôle de l'activité de ces recombinaisons. D'un point de vue du transfert horizontal, le système XerCD/*dif* étant quasiment ubiquitaire chez les bactéries, il est théoriquement possible de trouver des IMEXs de manière très étendue dans le règne bactérien. Ces derniers pourraient donc avoir un poids important en terme d'évolution.

Au cours de ce manuscrit mes résultats seront organisés en trois parties. Dans la première je présenterai les travaux publiés portant sur la mécanistique de l'échange de brins lors de l'intégration et excision de TLC dans le chromosome de *V.cholerae*. Je replacerai également TLC dans un contexte de compréhension de renouvellement de la toxine cholérique chez *V.cholerae* en démontrant que l'excision de TLC permet de co-exciser CTX et réinitialiser le site *dif* en le délétant de tout IMEXs dans les nombreux cas où TLC est le premier IMEXs intégré.

Au cours de la seconde partie, je mettrai en avant la découverte d'un facteur phagique nécessaire à l'intégration de TLC. J'étudierai par des approches de génétique, biochimie et de biologie moléculaire le mécanisme d'action de cette protéine pour comprendre par quel moyen elle contrôle l'activité des Xer.

Au sein d'une troisième partie, je présenterai les travaux réalisés en collaboration avec un autre membre de l'équipe et visant à comprendre les fines disparités observées entre les Xer de *V.cholerae* et *E.coli* notamment concernant la dépendance de la formation de dimères de chromosomes pour permettre la recombinaison Xer.

Chacune des parties "Résultats" sera discutée séparément, mais je finirai ce manuscrit par une discussion générale suivie de perspectives.

Chapitre 2

Résultats partie I : TLC ϕ
s'intègre dans la génome de
V.cholerae en utilisant une voie
de recombinaison initiée par
XerD et indépendante de
l'activation par FtsK - résultats publiés

(Midonet et al. *PNAS*, 2014)

2.1 Contexte

Vibrio cholerae est une bactérie marine dont la plupart des souches sont non pathogènes. Bien que des formes planctoniques existent *V.cholerae* se développe surtout sous forme de biofilm à la surface des sédiments, et sur la chitine des crustacés [150]. La conversion des souches environnementales

de *V.cholerae* en souches pathogènes se fait principalement via l'acquisition par transfert horizontal des deux facteurs majeurs de pathogénicité. Le premier est la capacité à exprimer à sa surface le pilus TCP (Toxin Co-regulated Pilus) qui permet la colonisation intestinale [151]. Le second est la capacité à synthétiser la toxine cholérique responsable des diarrhées mortelles caractéristiques du choléra [152]. Les sous-unités A et B de la toxine cholérique sont encodées par le génome d'un phage filamenteux intégratif CTX Φ appartenant aux IMEXs [153] et se servant notamment de TCP pour son adsorption [154]. Ces deux facteurs sont indispensables à l'expansion d'un clone pandémique [151].

La composition et l'organisation des IMEXs intégrés dans les isolats cliniques de la souche pandémique O1 El Tor responsable de la 7ème pandémie diffèrent (voir Figure 2.1) [155, 156, 136].

Cette variabilité suggère une mobilité importante de ces éléments génétiques [156, 155], ce qui pouvait être attendu puisque les recombinaisons Xer sont toujours actives pour les événements de recombinaison au site *dif* et notamment pour la CDR. Néanmoins nous avons vu dans l'introduction que les deux catégories d'IMEXs étudiées présentent un mécanisme d'excision partielle pour les IMEXs de type VGJ Φ , et une incapacité d'excision Xer pour les IMEXs de type CTX Φ . *V.cholerae* nécessite CTX pour l'expansion d'un clone pandémique. Il est alors étonnant de trouver différents variants de CTX Φ intégrés dans les isolats cliniques d'une même souche pandémique O1 El Tor (Figure 2.2). De plus la position relative des ces variants CTX par rapport aux autres IMEXs intégrés change également. Par exemple, les dérivés de type RS1 Φ qui appartiennent aux IMEXs de type CTX ϕ , sont présents à des positions différentes par rapport à CTX Φ . La toxine cholérique étant encodée par le génome de CTX Φ , il aurait été

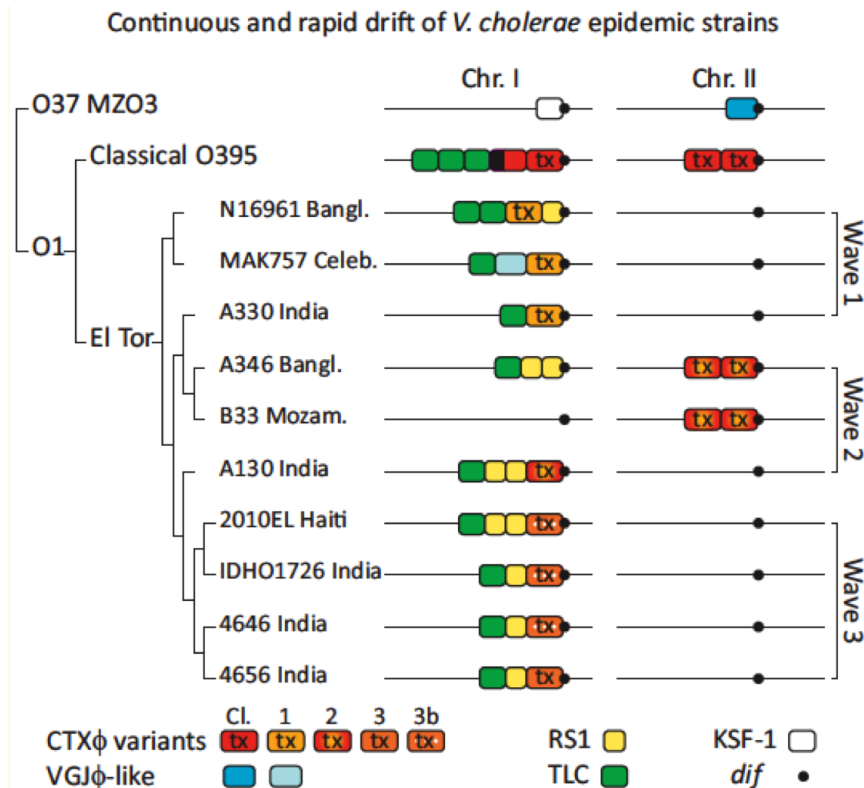


FIGURE 2.1 – Schéma représentant les variations de compositions en IMEXs intégrés au chromosome I et II chez *V. cholerae* au sein de la même souche pandémique O1 El Tor responsable de la 7ème pandémie. Basé sur les données de *Mutreja et al.* [155] et de *Chun et al.* [156]. Abréviations : Bangl. : Bangladesh ; Celeb. : îles Célèbes ; Mozam. : Mozambique. KSF-1 est un phage filamenteux appartenant à la même classe d’IMEXs que VGJ. Les lignes noires représentent partiellement les chromosomes I et II. Les points noirs indiquent un site *dif*. *Tiré de Das B. et al.* [136]

attendu de trouver le même variant de CTX Φ et à la même position à travers ces différents isolats cliniques. Plusieurs modèles ont donc été proposés pour expliquer ces remaniements, la plupart d’entre eux reposant sur la recombinaison homologue [157, 158, 159, 160, 158].

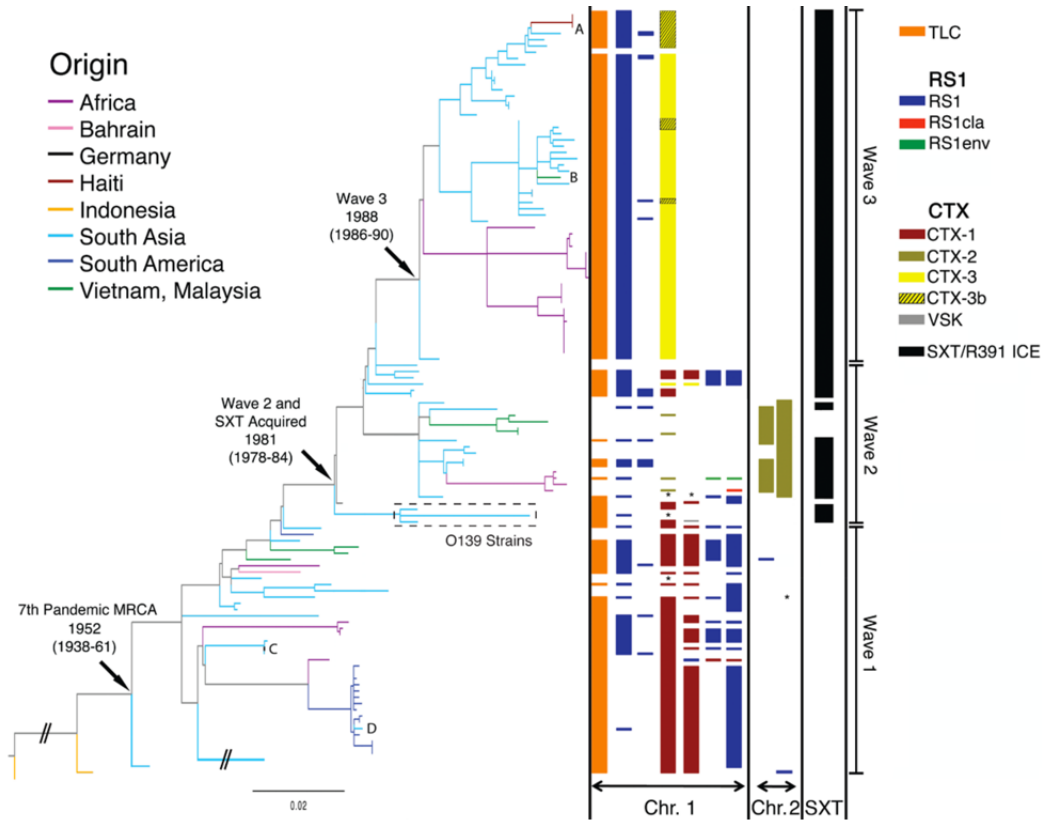


FIGURE 2.2 – **Arbre phylogénétique (maximum de vraisemblance) des souches de *V.cholerae* responsables de la 7ème pandémie.** Arbre basé sur le polymorphisme nucléotidique du core génome (SNP) et excluant les évènements de recombinaison. L'isolat M66 pré-7ème pandémie a été utilisé comme groupe extérieur pour enracer l'arbre. Les branches sont colorées selon la région d'isolation de la souche. A droite sont indiquées à quelles vagues appartiennent les souches. Les nœuds représentent l'ancêtre commun le plus récent de la 7ème pandémie (MRCA), puis des vagues 2 et 3. La présence des éléments mobiles SXT et CTX ainsi que les différents variants est indiquée à droite. La présence de IMEXs de type RS1 et TLC est également indiquée mais leur nombre et leur position sont arbitrairement désignés. A-D marquent les cas de transmission sporadique internationale. Les dates sont calculées selon la médiane prise à partir des résultats de l'analyse BEAST. * = pas de données. *Tiré de Mutreja et al. [155]*

En 1998 E. Rubin remarqua que $TLC\Phi$ est présent dans la quasi totalité de ces différents isolats cliniques [147]. De par sa position la plus éloignée de *dif* on peut déduire qu'il est à chaque fois le premier IMEXs intégré.

Cette observation fut par la suite confirmée par des analyses bioinformatiques [156]. Il fut alors proposé que $TLC\Phi$ joue un rôle dans l'acquisition de $CTX\Phi$ [147, 148].

Les sites *attP* des IMEXs de type $TLC\Phi$ possèdent une région centrale identique au site cible. Un échange de brins catalysé par l'une ou l'autre des recombinases est donc possible. Néanmoins le site *attP* de $TLC\Phi$ (*attPTLC*) possède une région de fixation pour XerD qui diffère fortement de la séquence consensus du site de fixation de XerD sur un site *dif*, avec seulement 3/11 des paires de bases conservées. Il est possible que ce site soit affecté pour la fixation de XerD et que cela soit délétère pour la formation de la synapse de recombinaison. Il est donc légitime de douter de l'efficacité de ces sites en terme de recombinaison. On notera néanmoins une variabilité dans le nombre de copies de TLC présentes dans les différentes souches de *V. cholerae*. Ceci suggèrent que $TLC\Phi$ est toujours mobile malgré ce site dégénéré et que les mutations dans son site *attP* ne se sont pas effectuées post-intégration comme il a été proposé pour expliquer la stabilité du GGI chez *Neisseria* [161].

Si $TLC\Phi$ est capable de s'exciser par recombinaison *attPTLC/dif*, cela génèrerait une co-excision de tous les IMEXs intégrés après $TLC\Phi$. Le site *dif* initial de la souche serait alors reformé et de nouveaux événements d'intégrations créeraient différents arrangements d'IMEXs au sein d'une même souche pandémique.

Au cours de la première partie de ma thèse, j'ai étudié par des approches de génétique le mécanisme d'intégration/excision de $TLC\Phi$. Celui-ci pourrait servir de paradigme pour les IMEXs de la même catégorie. J'ai également testé si la co-excision $TLC\phi$ - $CTX\phi$ était possible via un évène-

ment de recombinaison spécifique de site catalysé par Xer et s'effectuant entre *attPTLC* et *dif1*.

2.2 Article

XerD-mediated FtsK-independent integration of TLC ϕ into the *Vibrio cholerae* genome

Caroline Midonet¹, Bhabatosh Das^{1,2}, Evelyne Paly, and Francois-Xavier Barre³

Institute for Integrative Biology of the Cell (I2BC), Université Paris Saclay, Commissariat à l'Énergie Atomique, CNRS, Université Paris Sud, 91198 Gif sur Yvette, France

Edited by David J. Sherratt, University of Oxford, Oxford, United Kingdom, and accepted by the Editorial Board October 7, 2014 (received for review March 5, 2014)

As in most bacteria, topological problems arising from the circularity of the two *Vibrio cholerae* chromosomes, *chrI* and *chrII*, are resolved by the addition of a crossover at a specific site of each chromosome, *dif*, by two tyrosine recombinases, XerC and XerD. The reaction is under the control of a cell division protein, FtsK, which activates the formation of a Holliday Junction (HJ) intermediate by XerD catalysis that is resolved into product by XerC catalysis. Many plasmids and phages exploit Xer recombination for dimer resolution and for integration, respectively. In all cases so far described, they rely on an alternative recombination pathway in which XerC catalyzes the formation of a HJ independently of FtsK. This is notably the case for CTX ϕ , the cholera toxin phage. Here, we show that in contrast, integration of TLC ϕ , a toxin-linked cryptic satellite phage that is almost always found integrated at the *chrI dif* site before CTX ϕ , depends on the formation of a HJ by XerD catalysis, which is then resolved by XerC catalysis. The reaction nevertheless escapes the normal cellular control exerted by FtsK on XerD. In addition, we show that the same reaction promotes the excision of TLC ϕ , along with any CTX ϕ copy present between *dif* and its left attachment site, providing a plausible mechanism for how *chrI* CTX ϕ copies can be eliminated, as occurred in the second wave of the current cholera pandemic.

cholera | site-specific DNA recombination | lysogenic conversion | chromosome segregation | lateral gene transfer

The causative agent of the epidemic severe diarrheal disease cholera is the *Vibrio cholerae* bacterium. A major determinant of its pathogenicity, the cholera enterotoxin, is encoded in the genome of the filamentous cholera toxin phage, CTX ϕ (1). Like many other *V. cholerae* filamentous phages, CTX ϕ uses a host chromosomally encoded, site-specific recombination (Xer) machinery for lysogenic conversion (2–4). The Xer machinery normally serves to resolve chromosome dimers, which result from homologous recombination events between the two chromatids of circular chromosomes during or after replication. In *V. cholerae*, as in most bacteria, the Xer machinery consists of two tyrosine recombinases, XerC and XerD. They act at a unique specific chromosomal site, *dif*, on each of the two circular chromosomes, *chrI* and *chrII*, of the bacterium (5). Integrative mobile elements exploiting Xer (IMEXs) carry a *dif*-like site on their circular genome, *attP* (3, 4) (Fig. 1A). XerC and XerD promote their integration by catalyzing a recombination event between this site and a cognate chromosomal *dif* site (3, 4) (Fig. 1A). Based on the structure of their *attP* site, IMEXs can be grouped into at least three families (3, 4) (Fig. 1B). In all cases, however, a new functional *dif* site is restored after integration, which permits multiple successive integration events (Fig. 1A). Indeed, most clinical and environmental *V. cholerae* isolates harbor large IMEX arrays (6, 7).

IMEX array formation participates in the continuous and rapid dissemination of new cholera toxin variants in at least three ways. First, CTX ϕ integration is intrinsically irreversible because the active form of its *attP* site consists of the stem of a hairpin of its ssDNA genome, which is masked in the host dsDNA genome (8, 9) (Fig. 1A and B). However, free CTX ϕ genome copies can

be produced by a process analogous to rolling circle replication after the integration of a second IMEX harboring the same integration/replication machinery, such as the RS1 satellite phage, which permits the production of new CTX ϕ viral particles (10). Second, the *V. cholerae* Guillermo Javier filamentous phage (VGJ ϕ) belongs to a second category of IMEXs whose *attP* site permits cycles of integration and excision by Xer recombination (11). VGJ ϕ excision allows for the formation of hybrid molecules harboring the concatenated genomes of CTX ϕ and VGJ ϕ , provided that VGJ ϕ integrated before CTX ϕ (11). The hybrid molecules can be packaged into VGJ ϕ particles. VGJ ϕ particles have a different receptor than CTX ϕ , which permits transduction of the cholera toxin genes to cells that do not express the receptor of CTX ϕ (11–13). Finally, integration of the toxin-linked cryptic phage (TLC ϕ), a satellite phage that defines a third category of IMEXs, seems to be a prerequisite to the toxigenic conversion of many *V. cholerae* strains (14, 15). IMEXs from this family are found integrated in the genome of many bacteria outside of the Vibrios, including human, animal, and plant pathogens, which sparked considerable interest in the understanding of how they exploit the Xer machinery at the molecular level (3, 4).

Xer recombination sites consist of 11-bp XerC and XerD binding arms, separated by an overlap region at the border of which recombination occurs (Fig. 1B). XerC and XerD each promote the exchange of a specific pair of strands (Fig. 1B). Recombination between *dif* sites is under the control of a cell division protein, FtsK, which restricts it temporally to the time of constriction and spatially to a specific zone within the terminus region of chromosomes (16–19). FtsK triggers the formation of a Holliday junction (HJ) by XerD catalysis, which is converted

Significance

Our results indicate that integration and excision of the toxin-linked cryptic satellite phage TLC ϕ depend on a Xer recombination pathway different from the pathways so far described for other integrative mobile elements exploiting Xer (IMEXs) and for plasmid and chromosome dimer resolution. They also provide the most likely mechanism for the complete elimination of IMEX arrays that occurred in some *Vibrio cholerae* strains of the second wave of the current cholera pandemic.

Author contributions: C.M., B.D., and F.-X.B. designed research; C.M., B.D., and E.P. performed research; C.M., B.D., E.P., and F.-X.B. contributed new reagents/analytic tools; C.M., B.D., and F.-X.B. analyzed data; and C.M., B.D., and F.-X.B. wrote the paper.

The authors declare no conflict of interest.

This article is a PNAS Direct Submission. D.J.S. is a guest editor invited by the Editorial Board.

Freely available online through the PNAS open access option.

¹C.M. and B.D. contributed equally to this work.

²Present address: Centre for Human Microbial Ecology, Translational Health Science and Technology Institute, Gurgaon 122016, India.

³To whom correspondence should be addressed. Email: barre@cgm.cnrs-gif.fr.

This article contains supporting information online at www.pnas.org/lookup/suppl/doi:10.1073/pnas.1404047111/-/DCSupplemental.

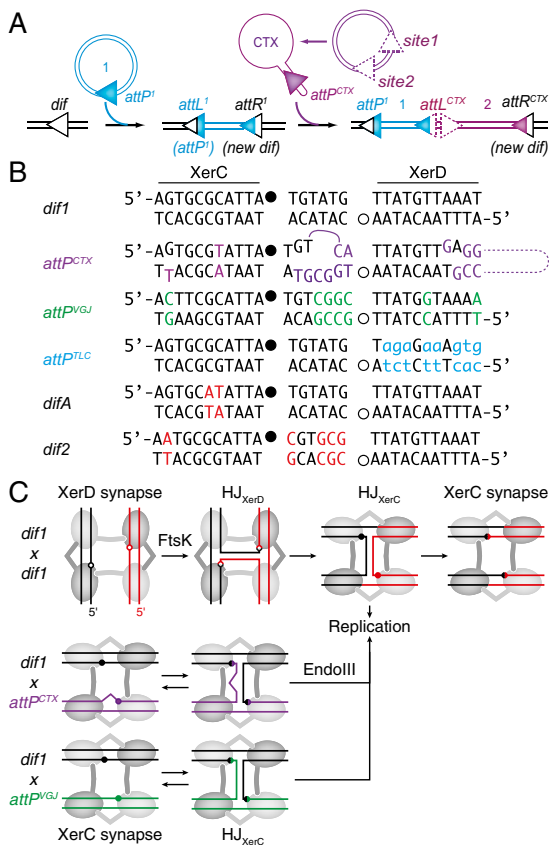


Fig. 1. Systems that use Xer. (A) Scheme depicting the sequential integration of IMEXs. Triangles represent *attP* and *dif* sites, pointing from the XerD binding site to the XerC binding site. Chromosomal DNA (black), TLC ϕ DNA (blue), and CTX ϕ DNA (magenta) are indicated. Dotted triangles represent nonfunctional CTX ϕ sites. (B) Sequence alignment of *dif1*, *attP^{CTX}*, *attP^{VGJ}*, *attP^{TLC}*, *difA*, and *dif2*. Bases differing from *dif1* are indicated in color. Bases that do not fit the XerD binding site consensus are indicated in lowercase. XerC (●) and XerD (○) cleavage points are indicated. (C) Xer recombination pathways. XerC (light gray circles), XerD (dark gray circles), *dif* sites (red and black lines), and *attP^{CTX}* and *attP^{VGJ}* (magenta and green lines) are indicated. XerC and XerD catalysis-suitable conformations are depicted as horizontal and vertical synapses, respectively. Cleavage points are indicated as in B.

into product by XerC catalysis after isomerization (20, 21) (Fig. 1C). The intermediate HJ is stable enough to be converted into product by replication when XerC catalysis is impeded (5, 17) (Fig. 1C). The integration of IMEXs of the CTX ϕ and VGJ ϕ families escapes FtsK control. The lack of homology in the overlap regions of their *attP* sites and the *dif* sites they target prevents any potential XerD-mediated strand exchange (Fig. 1B). CTX ϕ and VGJ ϕ rely on the exchange of a single pair of strands by XerC catalysis for integration, with the resulting HJ being converted into product by replication (8, 9, 11) (Fig. 1C). In the case of CTX ϕ , integration is facilitated by an additional host factor, EndoIII, which impedes futile cycles of XerC catalysis once the pseudo-HJ is formed (22) (Fig. 1C). In contrast, the overlap region of TLC ϕ *attP*, *attP^{TLC}*, is fully homologous to the overlaps of *dif1* and *difA*, the two sites in which it was found to be integrated (Fig. 1B). Four integration pathways could thus be considered, depending on whether recombination is initiated by XerC or XerD catalysis, and whether it ends with a second pair of strand exchange or not. In addition, *attP^{TLC}* lacks

a consensus XerD binding site, which could affect the whole recombination process (Fig. 1B).

Here, we show that *attP^{TLC}* is a poor XerD binding substrate. Nevertheless, we show that TLC ϕ integration is initiated by XerD catalysis and that the resulting HJ is converted into product by XerC catalysis. We further show that TLC ϕ integration is independent of FtsK. Finally, we demonstrate that the same reaction can lead to the excision of TLC ϕ -CTX ϕ arrays, providing a plausible mechanism for how all of the CTX ϕ copies integrated on *V. cholerae* chrI can be eliminated in a single step, as occurred in ancestors of strains from the second wave of the current cholera pandemic (23–25).

Results

XerC-Mediated *dif1*-Specific Integration of TLC ϕ . The complete genome of TLC ϕ was obtained by PCR amplification using N16961 genomic DNA as a template (15). It was labeled with a *cat* resistance gene and was delivered to *V. cholerae* by conjugation. The presence of 1.8 kbp of additional DNA, including the resistance marker, did not impede TLC ϕ -dependent replication and integration in *V. cholerae* (Figs. 2–4). To detect TLC ϕ -integration events, we used a colorimetric screen based on functional *Escherichia coli lacZ-dif* fusions that were inserted in place of the *dif* site of one or the other of the two *V. cholerae* chromosomes, the endogenous *V. cholerae lacZ* gene and the *dif* site of the other chromosome having been deleted (7). IMEX integration disrupts the *lacZ-dif* ORF, which leads to the appearance of white colonies and/or white sectors (7, 9).

The overlap regions of the *dif* sites found in different *V. cholerae* strains are polymorphous. The chrII *dif* site of all *V. cholerae* strains characterized so far is *dif2* (Fig. 1B). The most common chrI *dif* site of clinical isolates is *dif1* (Fig. 1B). Several environmental strains carry a variant of *dif1*, *difA*, with the same overlap region (Fig. 1B). Delivery of TLC ϕ to a strain harboring *lacZ-dif1* or *lacZ-difA* reporters led to the appearance of white sectors in the resulting chloramphenicol-resistant colonies (Table 1). TLC ϕ integration was below the detection limit in the absence of either XerC or XerD, suggesting that the presence of both recombinases was absolutely required for the process (Table 1). Not a single integration event was observed using a *lacZ-dif2* reporter, demonstrating the specificity of the process (Table 1).

***attP^{TLC}* Lacks a Bona Fide XerD Binding Arm.** The XerD binding arm of *attP^{TLC}* differs from the highly conserved XerD binding motif consensus of bacteria by 8 bp out of 11 bp (Fig. 1B). Correspondingly, XerD did not retard the electrophoretic migration of *attP^{TLC}* in an acrylamide gel under conditions in which it efficiently retarded the migration of *dif1* (Fig. 2A). In contrast, XerC bound as efficiently to *attP^{TLC}* as it did to *dif1* (Fig. 2A). Nevertheless,

Table 1. Integration rate of TLC ϕ after 36 h of growth on plates

Host	<i>attB</i> (chrI/chrII)	<i>attP</i>	Xer machinery	Integration, %
B51	<i>dif1</i> -	TLC		3.25 ± 0.59
B547	<i>difA</i> -	TLC		6.81 ± 0.25
B53	- <i>dif2</i>	TLC		<0.06
B510	<i>dif1</i> -	TLC	Δ xerC	<0.06
B549	<i>dif1</i> -	TLC	Δ xerD	<0.06
B551	<i>dif1</i> -	TLC	XerCYF	0.26 ± 0.01
B550	<i>dif1</i> -	TLC	XerDYF	<0.06
B51	<i>dif1</i> -	C*		0.72 ± 0.18
B51	<i>dif1</i> -	D*		<0.02

Results were obtained in at least three independent experiments. Over 1,000 colonies were screened for each condition. XerCYF and XerDYF are the catalytically inactive forms of the recombinases. C* and D* are modified sites inhibiting XerC and XerD strand exchanges, respectively.

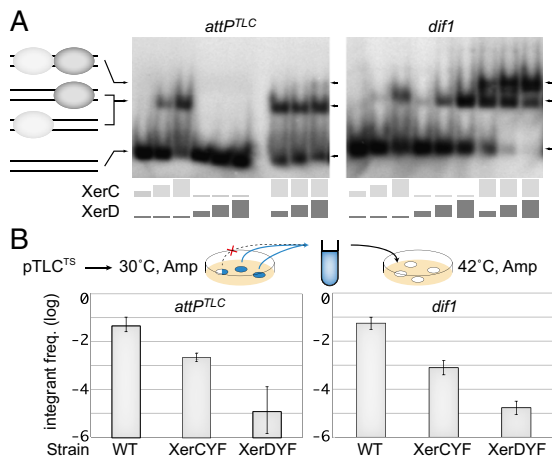


Fig. 2. Integration of *dif1* and TLC ϕ TS plasmids. (A) In vitro XerCD binding assay on *attP^{TLC}* and *dif1*. Light and dark gray rectangles indicate the respective concentrations of XerC (0 μ g/mL, 15 μ g/mL, 30 μ g/mL, and 45 μ g/mL) and XerD (0 μ g/mL, 3.9 μ g/mL, 7.9 μ g/mL, and 11.8 μ g/mL) in each lane. A scheme of the different products is indicated to the left of the gels. (B) Frequency (freq.) of integrants after overnight growth at the permissive temperature. A schematic of the assay is shown above the results. The frequency of integrants was estimated in pools of colonies without any visible integration after overnight growth (full blue circles). Colonies with visible integration were discarded (blue circles with white sectors). The results are shown on a logarithmic scale. Amp, ampicillin; WT, WT cells; XerCYF and XerDYF, strains harboring catalytically inactive XerC and XerD alleles, respectively.

a faint band corresponding to the joint binding of XerC and XerD to *attP^{TLC}* could be detected when the two recombinases were added together, suggesting that cooperative interactions between the recombinases partially compensated for the defective *attP^{TLC}* XerD binding arm (Fig. 2A).

XerD Catalysis Is Necessary and Sufficient for TLC ϕ Integration. TLC ϕ integration was not abolished in a strain in which the catalytic tyrosine of XerC was replaced by a phenylalanine (XerCYF) but went below the level of detection of the assay in a strain in which the catalytic tyrosine of XerD was replaced by a phenylalanine (XerDYF, Table 1). Catalytic mutations often affect substrate binding (26). We were therefore cautious about the TLC ϕ integration results obtained in the XerDYF background because the lesser binding affinity of XerDYF could cumulate with the defective XerD binding arm of *attP^{TLC}* (Fig. 2A). The exchange of strands promoted by tyrosine recombinases requires the stabilization of the invading strands by base-pairing interactions (9). Based on this rule, we introduced specific mutations in the recombination sites to block XerC or XerD strand exchanges, respectively (C* and D* mutations, Fig. 3A and Fig. S1). The presence of the C* mutation did not abolish TLC ϕ integration, whereas no integrants were observed in the presence of the D* mutation (Table 1).

An advantage of the colorimetric assay is that it can be used with replicative forms. However, it only provides qualitative results because the detection of white sectors depends on the size of the colonies, which is notably linked to the fitness of the strains. To obtain a quantitative view of the efficiency of integration, we used antibiotic resistance as a selection method for the integration of a replication-deficient form of TLC ϕ . To this end, a portion of the TLC ϕ genome lacking the whole of the *cri* nickase gene was cloned into a conjugative plasmid harboring a conditional thermosensitive (TS) origin of replication (Table S1). Disruption of the reporter *dif-lacZ* ORF was used to validate the specificity of the integration

events. We monitored the frequency of integrants in fully blue colonies (i.e., in colonies in which integration was not yet visible), which were obtained after overnight growth at the permissive temperature under antibiotic selection (Fig. 2B). A TS suicide vector harboring *dif1* was used as a control to validate the assay. For both *dif1* and TLC ϕ TS vectors, a 10-fold drop in integration was observed in the XerCYF background and a 100-fold drop was observed in the XerDYF background (Fig. 2B).

Results obtained with TS suicide vectors harboring C* and D* *attP^{TLC}* were identical to the results obtained with WT *attP^{TLC}* in XerCYF and XerDYF backgrounds, respectively (Fig. 3B). The frequencies of C* and D* *dif1* integrants were 10-fold higher than the frequencies obtained with *dif1* in the XerCYF and XerDYF backgrounds, respectively (Fig. 3B). However, D* *dif1* integrants remained 100-fold less frequent than C* *dif1* integrants (Fig. 3B).

***attP^{TLC}* Integration Is Less Efficient Than *dif1* Integration.** The frequency of integrants in colonies harboring a TS vector corresponds to the overnight growth integration/excision equilibrium. To compare the integration efficiencies of *dif1* and TLC ϕ TS

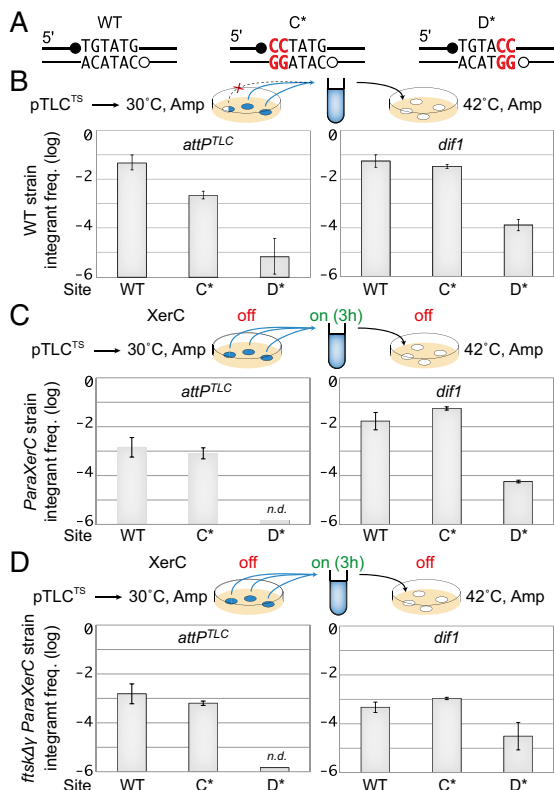


Fig. 3. Integration of *dif1* and TLC ϕ TS plasmids harboring C* and D* mutated overlap regions. (A) Scheme of the WT, C*, and D* overlap regions. Mutations are indicated in red. Positions of XerC (●) and XerD (○) cleavage are indicated. (B) Frequency of integrants after overnight growth at the permissive temperature obtained with WT, C*, and D* versions of *dif1* and *attP^{TLC}*. The scheme legend is as in Fig. 2B. (C) Frequency of integrants after 3 h of growth at the permissive temperature in XerC-inducible cells. n.d., none detected; off, no XerC induction; on, XerC induction; ParaXerC, production of XerC from under the pAra promoter integrated at the xerC locus. The rest of the legend is as in Fig. 2B. (D) Frequency of integrants after 3 h of growth at the permissive temperature in *P_{ara}XerC ftsKΔ7* cells. The legend is as in C.

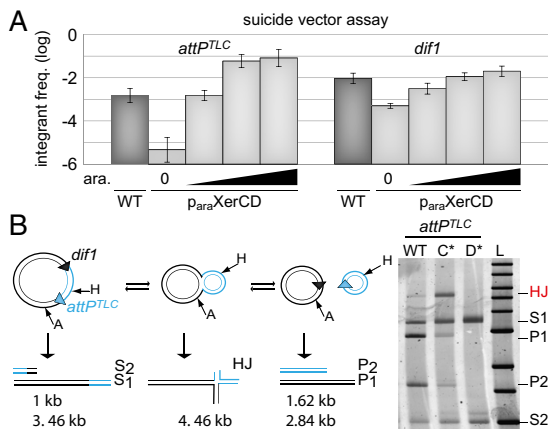


Fig. 4. XerC promotes the resolution of the *attP^{TLC}/dif1* HJ recombination intermediate. (A) Frequency of integrants of *dif1* and TLC ϕ suicide vectors after 3 h of conjugation. WT, native promoter production of the recombinases; p_{ara}XerCD, production of the recombinases from a *xerC-xerD* operon under the pAra promoter integrated at the *xerC* locus; 0, no arabinose (ara). The gradual percentages of arabinose (black triangles; 0.002%, 0.02%, and 0.2%) are indicated. (B) Intramolecular recombination between plasmid-borne *dif1* and *attP^{TLC}* sites. (Left) Scheme of the substrate and of the recombination products. Arrows indicate the restriction sites used to differentiate fragments of the plasmid substrate (S1 and S2) from the HJ intermediate (HJ) and the full recombination products (P1 and P2). WT, C*, and D* indicate WT, C*, and D* versions of *attP^{TLC}*, respectively. A, AlwNI; H, HpaI.

vectors after a shorter time of growth, we used a strain in which the *xerC* gene was placed under the control of the arabinose promoter. The *dif1* integrants were as frequent after 3 h of induction as after overnight growth, suggesting comparable excision and integration rates (Fig. 3C). This result fits well with the function of *dif1*, with the excision of the *dif1* TS vector mimicking chromosome dimer resolution (19). Interestingly, a slightly higher integration frequency was observed with C* *dif1* than with *dif1*, suggesting that completion of the *dif1* recombination process by XerC catalysis might be more important for excision than for integration (Fig. 3C). In contrast, 10-fold fewer TLC ϕ integrants were obtained after 3 h of growth compared with overnight growth, suggesting that *attP^{TLC}* was less efficient than *dif1* integration, which was compensated for during overnight growth by an even lower excision rate (Fig. 3C).

TLC ϕ Integration Escapes FtsK Control. Integration of a TS vector harboring *dif1* was 100-fold less efficient when the chromosomal *dif1* target site was displaced to the *lacZ* locus, which is outside of the normal FtsK loading region in *V. cholerae* (19) (Fig. S2). In contrast, a TS TLC ϕ vector integrated as efficiently at the *lacZ* locus as at the *dif1* locus, suggesting that it was not under the control of FtsK (Fig. S2). In agreement, no change was observed in the frequency of integrants of WT, C*, and D* TLC ϕ TS vectors in FtsK $\Delta\gamma$ cells compared with WT cells (Fig. 3D). As a point of comparison, note that a 10-fold decrease in the frequency of integrants of *dif1* TS vectors was obtained in FtsK $\Delta\gamma$ cells (Fig. 3D). The integration of C* *dif1* TS vectors was similarly affected, confirming that *dif1* integration relied on FtsK-dependent XerD catalysis (Fig. 3D). The residual integration observed with D* *dif1* TS vectors was not affected, further indicating that it was linked to an FtsK-independent pathway (Fig. 3D).

Quantity of XerC and XerD Is a Limiting Factor of TLC ϕ Integration. Because of the low binding efficiency of XerD to *attP^{TLC}*,

we speculated that the concentration of the Xer recombinases within the cell could be a limiting factor for *attP^{TLC}/dif1* recombination. To test this hypothesis, we engineered a strain in which XerC and XerD production was placed under the control of the arabinose promoter. In the absence of arabinose, integration of a nonreplicative *dif1* vector was over 10-fold less frequent than in a strain in which XerC and XerD were produced from their original promoters. Addition of arabinose increased *dif1* integration up to WT levels (Fig. 4A). Integration of a nonreplicative TLC ϕ vector was barely detectable in the absence of arabinose but reached a frequency almost 100-fold higher than the frequency obtained under normal XerCD production levels at 0.02% and 0.2% of arabinose (Fig. 4A). Western blot quantification of a His-tagged version of XerD suggested that at these two concentrations, the intracellular level of XerD was 100-fold higher than normal (Fig. S3).

***attP^{TLC}/dif1* HJs Are Resolved by XerC Catalysis.** Under conditions of expression of the Xer recombinases, TLC ϕ integration was as frequent as *dif1* integration, which suggested that *attP^{TLC}/dif1* recombination could be directly monitored on plasmids (Fig. 4A). Indeed, over 50% of a plasmid carrying *dif1* and *attP^{TLC}* in direct repeat was recombined after 3 h of arabinose induction (Fig. 4B). In addition, we observed a faint band migrating at the expected position of the HJ recombination intermediate (Fig. 4B). Two-dimensional gel analysis confirmed that this band corresponded to a four-way junction (Fig. S4). In similar experiments with tandem *dif* plasmids, *dif/dif* HJs were never detected, suggesting that they were more efficiently processed into product and/or back into substrate than *attP^{TLC}/dif1* HJs (5, 20).

Impeding XerD strand exchanges entirely abolished HJ and product formation, confirming that *attP^{TLC}/dif1* recombination was initiated by XerD catalysis (Fig. 4B). There is a perfect homology between the overlap regions of *dif1* and *attP^{TLC}*, which suggested that XerC catalysis might normally serve to convert *attP^{TLC}/dif1* HJs into product. In this case, impeding XerC catalysis would lead to HJ accumulation. In agreement with this idea, lesser recombination products and more HJs were detected when XerC-mediated strand exchanges were inhibited (Fig. 4B and Fig. S4). Taken together, these results demonstrate that *attP^{TLC}/dif1* recombination normally results from two successive pairs of strand exchange, with the first being promoted by XerD and the second by XerC.

XerCD Can Promote the Excision of an Integrated Copy of TLC ϕ . The *attP^{TLC}/dif1* intramolecular recombination reactions observed on plasmids mimic an excision reaction. Therefore, we decided to investigate the excision of chromosomal copies of TLC ϕ harboring the *sacB* counterselection gene. We used a nonreplicative form of TLC ϕ to ensure the rapid loss of any excised copy (Fig. 5A). WT, C*, and D* forms of the excision substrate were engineered by Xer site-specific recombination between *dif1* and an extra CTX ϕ *attP* (*attP^{CTX}*) (Fig. 5A). Note that Xer-mediated excision of the *sacB* counterselection gene can only be due to a recombination event between *attP^{TLC}* and *dif1* because the active form of *attP^{CTX}* is masked after integration. The correct arrangement of the different Xer recombination sites in the genome was checked by PCR.

Cells from colonies grown on chloramphenicol plates were diluted in fresh LB without antibiotic, grown until an OD₆₀₀ of 0.2–0.3 was attained, and were spread on sucrose plates. Sucrose-resistant colonies were checked for the loss of *cat*. The precision of the recombination events was verified by PCR. We thus found that TLC ϕ excision was possible but that it occurred much less frequently than its integration, in agreement with the results of Fig. 3 (Fig. 5A). Excision was affected by the presence of a D* mutation but not by a C* mutation, further suggesting that it relied on the same Xer recombination pathway as integration (Fig. 5A).

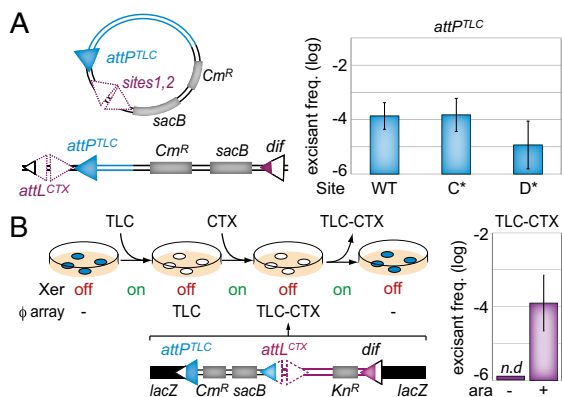


Fig. 5. TLC ϕ excision. (A) TLC ϕ -*sacB* excision assay. (Left) Scheme of the assay. Sites 1 and 2 of *attP^{CTX}* used to integrate the *attP^{TLC}*-*Cm^R*-*sacB* insert at *dif1* (purple triangles) and the *sacB* gene conferring sucrose sensitivity and the *cat* (*Cm^R*) gene conferring chloramphenicol resistance (gray rectangles) are indicated. (B) TLC ϕ -CTX ϕ excision assay. (Left) Scheme of the assay. ϕ array, integrated IMEXs; off, no arabinose induction of the recombinases; on, arabinose induction of the recombinases. (Right) In the absence of IMEXs, the *lacZ* gene is functional and colonies are blue on X-gal. After integration, colonies are white on X-gal. n.d., none detected.

TLC ϕ -Mediated Excision of CTX ϕ . The possibility of excising TLC ϕ by Xer recombination prompted us to check if *attP^{TLC}*/*dif1* recombination could lead to the joint excision of other IMEXs, particularly CTX ϕ . To this end, we engineered a TLC ϕ -CTX ϕ array at the *lacZ-dif1* locus in a strain in which XerCD production was under the control of the arabinose promoter (Fig. 5B). The array included a *cat* resistance gene and a *sacB* counterselection gene in the TLC ϕ prophage and a kanamycin resistance marker in place of the cholera toxin genes in the CTX ϕ prophage (Fig. 5B). The correct arrangement of the integrated forms of TLC ϕ and CTX ϕ within the strain was checked by PCR. Recovery of the capacity to produce β -gal production was used to ascertain the precision of the excision events. Note that the replicative form of CTX ϕ could be used because it is rapidly lost upon excision.

Induction of XerCD production led to the appearance of blue sucrose-resistant cells at a frequency of $\sim 3 \times 10^{-4}$ (Fig. 5B). No blue sucrose-resistant colonies were obtained in the absence of XerCD induction (Fig. 5B). All (246 of 246) of these blue sucrose-resistant colonies proved to be both kanamycin- and chloramphenicol-sensitive, as expected for complete IMEX excision events (Table S2). The precision of the excision events was further checked by PCR amplification of the resulting junctions in 32 blue sucrose-resistant colonies. Thus, the presence of a TLC ϕ copy on the *attL* side of an IMEX array can lead to its complete and precise excision by a single Xer-dependent recombination event. White sucrose-resistant colonies were also obtained. However, they were 10-fold less frequent than blue resistance colonies (Table S2). Their formation was independent of XerCD production (Fig. 5B). Only 71 of 108 of them were both kanamycin- and chloramphenicol-sensitive, with the others remaining resistant to one, the other, or both antibiotics (Table S2), and no specific pattern of rearrangement was observed by PCR. These results suggest that white sucrose-resistant colonies were due to partial deletion events and that no conservative recombination event other than Xer recombination can lead to the complete excision of IMEX arrays.

Discussion

Here, we characterized at the molecular level how TLC ϕ , one of the numerous IMEXs that are integrated in the genome of toxigenic variants of *V. cholerae*, exploits the Xer recombination

machinery of its host. We found that TLC ϕ defines a third IMEX category with a strategy of exploitation of the Xer machinery different from the strategies so far described for other IMEXs and in chromosome and plasmid dimer resolution. In addition, we demonstrated that TLC ϕ integration was reversible, which led to the joint elimination of any element that had integrated after it in a single Xer recombination step.

Paradoxical Strategy of Xer Recombination Exploitation. *attP^{TLC}* lacks a bona fide XerD binding site (Fig. 2A). Nevertheless, XerCD could efficiently recombine this degenerate half-site with *dif1* or *difA* (Fig. 2B and Table 1). To our knowledge, the only other tyrosine recombinase for which efficient recombination between half-sites has been observed is Flp, the flippase of the 2- μ m plasmid of *Saccharomyces cerevisiae*. Flp normally works as a homotetramer; however, in case of recombination between half-sites and full sites, the synapses imply three recombinases (27). In the case of Flp, trimer recombination is possibly related to the fact that active sites are assembled *in trans* (28). In contrast, Xer recombinases cleave DNA *in cis*. Using synthetic substrates designed specifically to impede the exchange of one or the other of the two strands, we further demonstrated that *attP^{TLC}*/*dif1* recombination was initiated by the exchange of the strands that were expected to be targeted by XerD (Figs. 2–5 and Table 1). Finally, we showed that recombination depended on XerD catalysis and that XerC catalysis was not necessary (Fig. 2 and Table 1). Taken together, these results suggested that recombination occurred within a heterotetramer containing two of each of the XerC and XerD molecules, with one of the two XerD molecules being bound to the degenerate half-site of *attP^{TLC}*. However, fully efficient recombination required the overproduction of the Xer recombinases, probably because the absence of a bona fide XerD binding site in *attP^{TLC}* impeded efficient synapse formation and/or destabilized synaptic complexes (Figs. 2 and 4).

The default states of XerC and XerD within most recombination synapses are active and inactive, respectively (17, 20, 21). In agreement with this idea, the Xer reactions exploited by all other mobile elements so far characterized, whether IMEXs or plasmids, are initiated by XerC catalysis. In this respect, the *attP^{TLC}*/*dif1* recombination pathway is similar to the chromosome dimer resolution pathway. However, in the case of chromosome dimer resolution, activation of XerD catalysis requires a direct interaction with the FtsK cell division protein, which restricts it spatially (19). In contrast, *attP^{TLC}*/*dif1* recombination is independent of FtsK (Fig. 3) and is not spatially restricted (Fig. S2). Finally, in all of the other IMEXs so far characterized, HJ intermediates cannot be processed into products by Xer catalysis. Instead, we found that XerC-mediated strand exchanges could resolve *attP^{TLC}*/*dif1* HJ intermediates into products (Fig. 4B). More HJs were observed upon inhibition of XerC-mediated strand exchanges, further suggesting that HJ resolution by a second pair of strand exchanges is more efficient than resolution by replication (Fig. 4B).

Putative Regulation of *attP^{TLC}*/*dif1* Recombination. All of the experiments presented in this study were performed using the whole or a large piece of the TLC ϕ genome. Indeed, we failed to detect any recombination events with *attP^{TLC}* alone. This observation suggests that *attP^{TLC}*/*dif1* recombination depends on factors additional to XerC and XerD. These factors could be implicated in synapse formation and/or activation of XerD catalysis. They could also help favor integration instead of excision. Future work will aim at identifying putative *attP^{TLC}*/*dif1* accessory elements and at characterizing their mechanism of action.

Contribution of TLC ϕ to the Evolution of Toxigenic *V. cholerae* Variants. Most clinical and environmental *V. cholerae* isolates harbor large IMEX arrays on chr1 (4, 6, 7). Their history of

formation can be traced based on the relative position of the different IMEXs they harbor. It does not reflect the phylogenetic lineage of the isolates, which suggests that chrI IMEXs are constantly eliminated and rapidly reacquired (3, 4). In particular, elimination of entire chrI IMEX arrays has occurred in the ancestors of some strains from the second wave of the current cholera pandemic, such as the B33 Mozambique *V. cholerae* strain (23). This scenario was experimentally reproduced under laboratory conditions (24, 25). Paradoxically, however, CTX ϕ integration is intrinsically irreversible (Fig. 1A). Here, we showed how TLC ϕ excision could lead to the precise elimination of entire chrI IMEX arrays (Fig. 5 and Table S2). Two other mechanisms have been proposed for the elimination of IMEX arrays. First, CTX ϕ copies can be eliminated in a stepwise fashion by homologous recombination events between any CTX ϕ and RS1 copies within an array (24, 25). However, entire elimination of the array implies a final recombination event between two regions of less than <18 nt of homology. Our results indicate that such recombination events are 10-fold less frequent than the single-step Xer-dependent excision of TLC ϕ –CTX ϕ arrays (Fig. 5). In addition, they are highly imprecise, with most of them leading to partial deletions (Table S2). Second, we previously reported that Xer-dependent excision was a key aspect of the life cycle of VGJ ϕ , which led to CTX ϕ excision, provided that VGJ ϕ integrated first (11). However, IMEXs of the VGJ ϕ family are only very rarely found integrated in front of CTX ϕ in the genome of clinical and environmental strains (4, 6, 7). In contrast, TLC ϕ is almost invariably the first integrated element of chrI IMEX arrays (4, 6, 7), probably because its integration is a prerequisite to CTX ϕ integration on this chromosome (14, 15). Taken together, these results suggest that Xer recombination between *attP*^{TLC} and *difI* is the most likely mechanism for the elimination of entire chrI IMEX arrays. Thus, TLC ϕ is a major contributor to the ecological cycle that allows for the constant and rapid acquisition of new cholera toxin gene variants via the continuous assembly and elimination of large IMEX arrays in clinical strains.

Materials and Methods

Strains and Plasmids. Relevant strains, plasmids, and oligonucleotides are described in Tables S1, S3, and S4, respectively. All *V. cholerae* reporter strains were constructed by natural transformation or by double-crossover integration/excision methods. Engineered strains were confirmed by PCR and sequencing.

EMSA Experiments. Five-nanomolar ³²P-labeled synthetic DNA probes obtained by the annealing of purified oligonucleotides were incubated with purified XerCD recombinases in a buffer containing 0.1 μ g/mL BSA, 100 mM NaCl, 40% (vol/vol) glycerol, 1 mM EDTA, and 25 mM Tris-HCl at pH 7.5. The different DNA/protein complexes were resolved by migration through a 5% (vol/vol) 29:1 acrylamide/bisacrylamide gel in 0.5x Tris/borate/EDTA for 2 h at 150 V at 4 °C.

Integration Assays. *E. coli* β 2163 donors and *V. cholerae* recipients were grown to an OD₆₀₀ of 0.3, mixed at a 1:10 ratio, and incubated for 3 h. Conjugants were selected for the plasmid antibiotic resistance and meso-diaminopimelic acid autotrophy. The specificity of the integration events of suicide vectors was checked using X-gal. TS vector conjugants were recovered at 30 °C on X-gal plates to select for fully blue colonies. Serial dilutions were then plated at 42 °C and at 30 °C to determine the overnight frequency of integrants. In the case of Xer-inducible strains, Xer production was induced for 3 h in liquid culture with an arabinose concentration of 0.2% before plating.

Excision Assays. Integrants harboring the *sacB* and *cat* genes were grown to an OD₆₀₀ of 0.2–0.3. Serial dilutions were plated on LB agar plates supplemented with 18% sucrose at 25 °C.

Intraplasmid Recombination Assay. Plasmids were electroporated into *V. cholerae* XerCD-inducible cells. Transformed fresh bacteria were grown to an OD₆₀₀ of 0.5 and induced with 0.2% arabinose for 3 h.

ACKNOWLEDGMENTS. We thank M. Blokesch and J. Bischerour for *V. cholerae* chromosomal engineering tools. This study received financial support from the Agence Nationale pour la Recherche [ANR-11-BLAN-O2401] and Fondation Bettencourt Schueller (2012 Coup d'Élan Award). C.M. was the recipient of a fellowship from the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche.

- Waldor MK, Mekalanos JJ (1996) Lysogenic conversion by a filamentous phage encoding cholera toxin. *Science* 272(5270):1910–1914.
- Huber KE, Waldor MK (2002) Filamentous phage integration requires the host recombinases XerC and XerD. *Nature* 417(6889):656–659.
- Das B, Bischerour J, Barre FX (2011) Molecular mechanism of acquisition of the cholera toxin genes. *Indian J Med Res* 133:195–200.
- Das B, Martínez E, Midonet C, Barre F-X (2013) Integrative mobile elements exploiting Xer recombination. *Trends Microbiol* 21(1):23–30.
- Val M-E, et al. (2008) FtsK-dependent dimer resolution on multiple chromosomes in the pathogen *Vibrio cholerae*. *PLoS Genet* 4(9):e1000201.
- Mutreja A, et al. (2011) Evidence for several waves of global transmission in the seventh cholera pandemic. *Nature* 477(7365):462–465.
- Chun J, et al. (2009) Comparative genomics reveals mechanism for short-term and long-term clonal transitions in pandemic *Vibrio cholerae*. *Proc Natl Acad Sci USA* 106(36):15442–15447.
- Val M-E, et al. (2005) The single-stranded genome of phage CTX is the form used for integration into the genome of *Vibrio cholerae*. *Mol Cell* 19(4):559–566.
- Das B, Bischerour J, Val M-E, Barre F-X (2010) Molecular keys of the tropism of integration of the cholera toxin phage. *Proc Natl Acad Sci USA* 107(9):4377–4382.
- Moyer KE, Kimsey HH, Waldor MK (2001) Evidence for a rolling-circle mechanism of phage DNA synthesis from both replicative and integrated forms of CTXphi. *Mol Microbiol* 41(2):311–323.
- Das B, Bischerour J, Barre F-X (2011) VGJphi integration and excision mechanisms contribute to the genetic diversity of *Vibrio cholerae* epidemic strains. *Proc Natl Acad Sci USA* 108(6):2516–2521.
- Campos J, et al. (2003) Novel type of specialized transduction for CTX phi or its satellite phage RS1 mediated by filamentous phage VGJ phi in *Vibrio cholerae*. *J Bacteriol* 185(24):7231–7240.
- Campos J, Martínez E, Izquierdo Y, Fando R (2010) VEJphi, a novel filamentous phage of *Vibrio cholerae* able to transduce the cholera toxin genes. *Microbiology* 156(Pt 1):108–115.
- Rubin EJ, Lin W, Mekalanos JJ, Waldor MK (1998) Replication and integration of a *Vibrio cholerae* cryptic plasmid linked to the CTX prophage. *Mol Microbiol* 28(6):1247–1254.
- Hassan F, Kamruzzaman M, Mekalanos JJ, Faruque SM (2010) Satellite phage TLC ϕ enables toxigenic conversion by CTX phage through *dif* site alteration. *Nature* 467(7318):982–985.
- Cornet F, Louarn J, Patte J, Louarn JM (1996) Restriction of the activity of the recombination site *dif* to a small zone of the *Escherichia coli* chromosome. *Genes Dev* 10(9):1152–1161.
- Barre FX, et al. (2000) FtsK functions in the processing of a Holliday junction intermediate during bacterial chromosome segregation. *Genes Dev* 14(23):2976–2988.
- Kennedy SP, Chevalier F, Barre FX (2008) Delayed activation of Xer recombination at *dif* by FtsK during septum assembly in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 68(4):1018–1028.
- Demarre G, et al. (2014) Differential management of the replication terminus regions of the two *Vibrio cholerae* chromosomes during cell division. *PLoS Genet* 10(9):e1004557.
- Aussel L, et al. (2002) FtsK is a DNA motor protein that activates chromosome dimer resolution by switching the catalytic state of the XerC and XerD recombinases. *Cell* 108(2):195–205.
- Zawadzki P, et al. (2013) Conformational transitions during FtsK translocase activation of individual XerCD-*dif* recombination complexes. *Proc Natl Acad Sci USA* 110(43):17302–17307.
- Bischerour J, Spangenberg C, Barre F-X (2012) Holliday junction affinity of the base excision repair factor Endo III contributes to cholera toxin phage integration. *EMBO J* 31(18):3757–3767.
- Faruque SM, et al. (2007) Genomic analysis of the Mozambique strain of *Vibrio cholerae* O1 reveals the origin of El Tor strains carrying classical CTX prophage. *Proc Natl Acad Sci USA* 104(12):5151–5156.
- Ghosh K, Guo F, Van Duyn GD (2007) Synapsis of *loxP* sites by Cre recombinase. *J Biol Chem* 282(33):24004–24016.
- Lee J, Jayaram M (1995) Role of partner homology in DNA recombination. Complementary base pairing orients the 5'-hydroxyl for strand joining during Flp site-specific recombination. *J Biol Chem* 270(8):4042–4052.
- Chen Y, Narendra U, Iype LE, Cox MM, Rice PA (2000) Crystal structure of a Flp recombinase-Holliday junction complex: Assembly of an active oligomer by helix swapping. *Mol Cell* 6(4):885–897.
- Kamruzzaman M, et al. (2014) RS1 satellite phage promotes diversity of toxigenic *Vibrio cholerae* by driving CTX prophage loss and elimination of lysogenic immunity. *Infect Immun* 82(9):3636–3643.
- Kim EJ, et al. (2014) Molecular Insights Into the Evolutionary Pathway of *Vibrio cholerae* O1 Atypical El Tor Variants. *PLoS Pathog* 10(9):e1004384.

Supporting Information

Midonet et al. 10.1073/pnas.1404047111

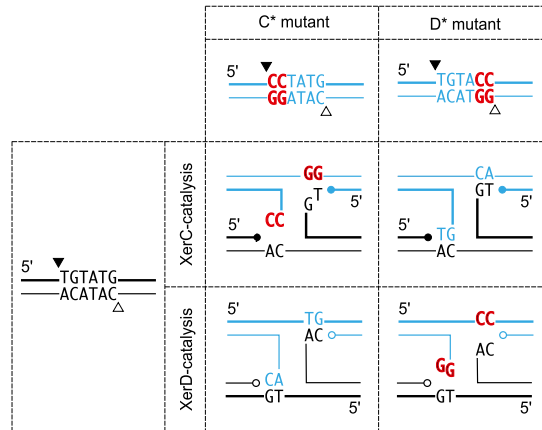


Fig. S1. C* and D* recombination sites that prevent XerC and XerD strand exchanges, respectively. WT recombination sites (black) and a mutated recombination site (blue) are indicated; mutations are indicated in bold and red. XerC (▼) and XerD (△) cleavage sites and XerC (●) and XerD (○) 3'-phosphotyrosyl links are indicated. A space between opposed bases indicates no stabilization by Watson–Crick or Wobble base-pairing interactions.

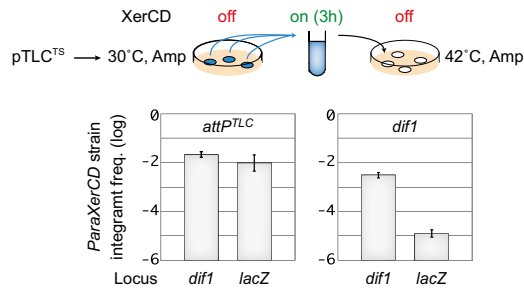


Fig. S2. TLC ϕ integration is not spatially restricted. Frequency of integrants after 3 h of growth at the permissive temperature in production of recombinases from a *xerC-xerD* operon under the pAra promoter integrated at the *xerC* locus ($p_{ara}XerCD$) cells. The legend is as in Fig. 3C.

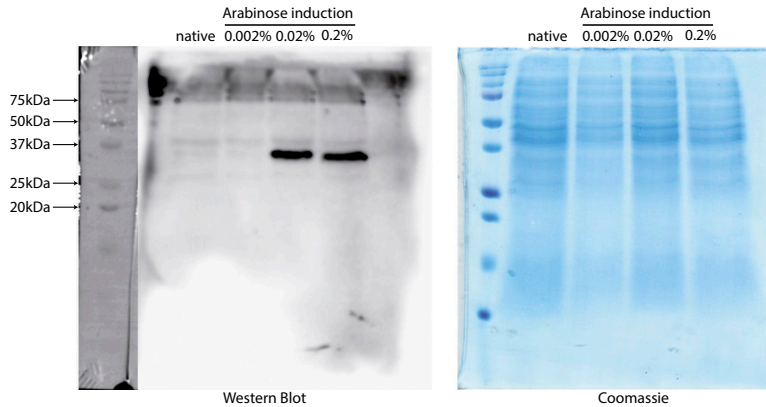


Fig. S3. Western blot analysis of strains carrying tagged XerD. Native, protein extract from cells producing 6His-XerD under the native promoter at the *xerD* locus; Arabinose induction, protein extract from cells producing XerC and 6His-XerD from an operon under the arabinose-inducible promoter inserted at the *xerC* locus. Cells were grown for 3 h in LB supplemented with 0.002%, 0.02%, or 0.2% arabinose. Cells were broken in 400 μ L of boiling 10% SDS before Laemmli treatment. Proteins were separated on a 14% acrylamide/bisacrylamide (29:1) SDS/PAGE gel. Two gels with the same amount of samples were done in parallel for Coomassie coloration and for transfer (Western blot). Blocking of the membrane was in TBS-Tween 0.1% + 5% milk. Washing steps were in TBS-Tween 0.1%. The primary antibody was anti-Tetra-His of mouse, and the secondary antibody was goat X-mouse HRP (Biorad), and they were used at a ratio of 1:1,000 in blocking buffer. The signals were detected with the SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate (Pierce) with a LAS3000 image reader (GE Healthcare). The molecular mass of 6His-XerD is 36.7 kDa. Bands were quantified using ImageJ (NIH). Arabinose (0.02% and 0.2%) led to 100-fold more XerD than native promoter.

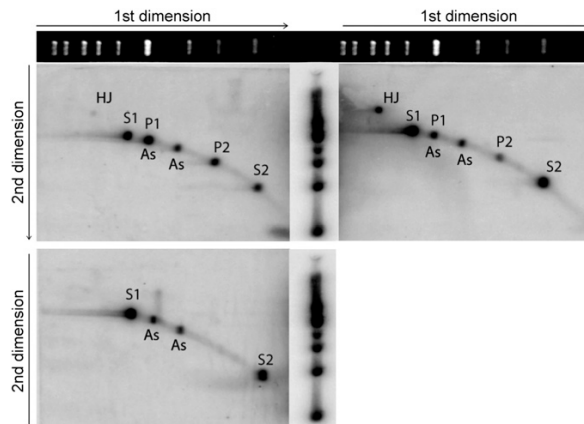


Fig. S4. HJ intermediate resolution by XerC catalysis. Plasmid intramolecular recombination between *dif1* and *attP^{TLC}* was induced for 3 h using 0.2% arabinose. The total genomic DNA of the strains was extracted and separated in the first dimension on a 0.7% agarose gel and in the second dimension on a 1.4% agarose gel in the presence of 10 μ g/mL ethidium bromide. (*Top Left*) Plasmid carrying a WT *attP^{TLC}* site. (*Top Right*) Plasmid carrying a C*-modified *attP^{TLC}* site. (*Bottom Left*) Plasmid carrying a D*-modified *attP^{TLC}* site. The radiolabeled plasmid was used as a probe for the assay. Horizontal scale: 1-kb ladder. Vertical scale: 1-kb ladder partially revealed by the Southern blot. S1, S2, P1, and P2 are plasmid substrate and products digested by HpaI and AlwNI. As, nonspecific labeling (also observed in cells lacking the plasmid).

Table S1. Plasmids

Name	Derived from	Properties	Source
pBS90	pSW23T	Ori R6K, Cm ^R , carrying replicative form of TLC	This study
pBS126	pSW23T	Ori R6K, Cm ^R , carrying suicide form of TLC (stop mutation in Cri = TLC*)	This study
pCM33	pSW23T	Ori R6K, Cm ^R , with partial suicide TLC, efficient for integration	This study
pCM39	pSW23T	Ori R6K, Cm ^R , partial suicide TLC with <i>attP^{TLC}*</i>	This study
pCM40	pSW23T	Ori R6K, Cm ^R , partial suicide TLC with <i>attP^{TLC}D*</i>	This study
pCM43	pSC101 <i>repA^{TS}</i>	TS vector, Amp ^R , partial suicide TLC	This study
pCM41	pSC101 <i>repA^{TS}</i>	TS vector, Amp ^R , partial suicide TLC with <i>attP^{TLC}C*</i>	This study
pCM42	pSC101 <i>repA^{TS}</i>	TS vector, Amp ^R , partial suicide TLC with <i>attP^{TLC}D*</i>	This study
pCM13	pSC101 <i>repA^{TS}</i>	TS vector, Amp ^R , with <i>dif1</i> site	This study
pCM18	pSC101 <i>repA^{TS}</i>	TS vector, Amp ^R , with <i>dif1</i> C* site	This study
pCM19	pSC101 <i>repA^{TS}</i>	TS vector, Amp ^R , with <i>dif1</i> D* site	This study
pBS79	pSW23T	Ori R6K, Cm ^R , with <i>dif1</i> site	This study
pBS114	pSW23T	Ori R6K, Cm ^R , with <i>dif1</i> C*	This study
pBS115	pSW23T	Ori R6K, Cm ^R , with <i>dif1</i> D*	This study
pBS66	pSW23T	Ori R6K, Cm ^R , CTX ϕ deleted for morphogenic genes, efficient for integration	(2)
pCM56	pSW23T	Ori R6K, Cm ^R , carrying <i>sacB</i> gene, with suicide TLC	This study
pEP68	pSW23T	Ori R6K, Cm ^R , <i>attP^{CTX}(+)</i> + suicide TLC ϕ <i>attP</i> + <i>sacB</i>	This study
pCM105	pSW23T	Ori R6K, Cm ^R , <i>attP^{CTX}(+)</i> + suicide TLC ϕ <i>attP</i> C* + <i>sacB</i>	This study
pCM106	pSW23T	Ori R6K, Cm ^R , <i>attP^{CTX}(+)</i> + suicide TLC ϕ <i>attP</i> D* + <i>sacB</i>	This study
pCM103	pUC18	Vector, Amp ^R , partial suicide TLC with <i>attP^{TLC}</i> and <i>dif1</i> in direct orientation	This study
pCM116	pUC18	Vector, Amp ^R , partial suicide TLC with <i>attP^{TLC}C*</i> and <i>dif1</i> in direct orientation	This study
pCM117	pUC18	Vector, Amp ^R , partial suicide TLC with <i>attP^{TLC}D*</i> and <i>dif1</i> in direct orientation	This study
pMEV69	pDS132	Integration/excision vector with UP and DWN regions of <i>lacZ</i> , to make $\Delta_{vib}lacZ$ strains	Laboratory collection
pUXBF13 and pTn7 hapR ⁺		Complemented <i>hapR</i> + Gm ^R	(3)
pCM011a	pUC18	Vector for natural transformation to have <i>dif1</i> -prophages:: <i>Ec</i> <i>lacZa-dif1-lacZb</i>	This study
pBJ31		pDS132-derived integration/excision vector to replace the <i>V. cholerae xerC</i> gene by an arabinose-inducible version (<i>araC-xerC-lacI-aadA1</i>)oriR6K, spec ^R , cm ^R	(4)
pCM54	pUC18	Vector of natural transformation carrying <i>SmR</i> (spec ^R), <i>lacI</i> , <i>araC</i> , and <i>vibXerCD</i> under <i>ara</i> promoter, flanking by UP and DWN regions of homologues around <i>vibXerC</i> (1 kb). Replace <i>vibXerC</i> by arabinose-inducible <i>vibXerCD</i> , Spec ^R , Amp ^R	This study
pGD191	pSC101	Vector of natural transformation to delete the gamma domain of FtsK, Zeo ^R , Amp ^R	This study
pBS98	pUC18	Vector of natural transformation carrying <i>sh ble</i> gene (zeo ^R) between UP and DWN region of homologues around <i>vibXerD</i> (1 kb); serves to remove <i>vibXerD</i>	This study
pBS104	pDS132	Integration/excision vector to replace <i>vibXerD</i> by <i>vibXerD_{VF}</i>	This study
pBS99	pKAS32	Integration/excision vector with UP and DWN regions of <i>vibXerD</i> and <i>sh ble</i> gene between them, to delete <i>vibXerD</i>	This study
pBS105	pDS132	Integration/excision vector to replace <i>vibXerC</i> by <i>xerC_{VF}</i>	This study
pMEV245	pDS132	pDS132 carrying the <i>arr2</i> (Rif ^R) cassette flanked by the upstream and downstream regions of <i>vibXerC</i> , Cm ^R	(1)
pKAS32		<i>rpsL</i> (<i>Strep^S</i>), OriR6K, <i>bla</i> (Amp ^R), oriT	(5)
pBJ37	pDS132	Integration/excision vector to replace <i>vibJlacZ::Ec</i> <i>lacZa-dif1-lacZb</i>	(1)
pMEV70	pDS132	Integration/excision vector to replace <i>dif1</i> -prophages:: <i>aaAd1</i>	
pCM144	pUC18	Vector of natural transformation to replace <i>XerD::FRT-sh ble-FRT</i> (Zeo ^R)	This study
pCM145	pUC18	Vector of natural transformation to have $\Delta_{vib}XerC::pAra$ <i>vibXerC-6His</i> <i>vibXerD</i>	This study
pCM146	pUC18	Vector of natural transformation to have $\Delta_{vib}XerD::6His$ <i>vibXerD</i> under native promoter	This study

Amp^R, ampicillin resistance; Cm^R, chloramphenicol resistance; Kn^R, kanamycin resistance; Rif^R, rifampicin resistance; Sm^R, spectinomycin resistance; Srep^S, streptomycin sensitivity; zeo^R, zeocin resistance.

- Das B, Bischerour J, Barre F-X (2011) VGJphi integration and excision mechanisms contribute to the genetic diversity of *Vibrio cholerae* epidemic strains. *Proc Natl Acad Sci USA* 108(6): 2516–2521.
- Bao Y, Lies DP, Fu H, Roberts GP (1991) An improved Tn7-based system for the single-copy insertion of cloned genes into chromosomes of gram-negative bacteria. *Gene* 109(1):167–168.
- Demarre G, et al. (2014) Differential management of the replication terminus regions of the two *Vibrio cholerae* chromosomes during cell division. *PLoS Genet* 10(9):e1004557.
- Das B, Bischerour J, Val M-E, Barre F-X (2010) Molecular keys of the tropism of integration of the cholera toxin phage. *Proc Natl Acad Sci USA* 107(9):4377–4382.
- Skorupski K, Taylor RK (1996) Positive selection vectors for allelic exchange. *Gene* 169(1):47–52.

Table S2. Xer recombination promotes a conservative recombination event that leads to the joint excision of TLC ϕ and CTX ϕ

Xer status	Blue colonies		White colonies				
	Frequency	Cm ^S , Kn ^S	Frequency	Cm ^S , Kn ^S	Kn ^S	Cm ^S	Cm ^R , Kn ^R
Xer ⁺	2.8 × 10 ⁻⁴ (in 2.7 × 10 ⁷ cells)	100% (246/246)	2.0 × 10 ⁻⁵ (in 2.9 × 10 ⁶ cells)	66% (71/108)	7.4% (8/108)	15% (16/108)	11.6% (13/108)
Xer ⁻	<10 ⁻⁶ (in 1.6 × 10 ⁶ cells)	—	2.2 × 10 ⁻⁵ (in of 1.6 × 10 ⁶ cells)				

Cm^S, chloramphenicol sensitive; Kn^S, ksnamycin sensitive.

Table S3. *Vibrio cholerae* strains

Name	Genotype	Source
BS47	CVC301 (N16961 <i>StrR Pcp18 araE</i>); $\Delta lacZ \Delta dif1$ -prophages:: <i>ecJlacZa-difA-lacZb</i>	This study
BS1	CVC301 (N16961 <i>StrR Pcp18 araE</i>); $\Delta lacZ \Delta dif1$ -prophages:: <i>ecJlacZa-dif1-lacZb; \Delta dif2::aad1</i>	(1)
BS3	CVC301 (N16961 <i>StrR Pcp18 araE</i>); $\Delta lacZ, \Delta dif1$ -prophages:: <i>aad1; \Delta dif2::ecJlacZa-dif2-lacZb</i>	(1)
BS10	CVC301 (N16961 <i>StrR Pcp18 araE</i>); $\Delta lacZ \Delta dif1$ -prophages:: <i>ecJlacZa-dif1-lacZb; \Delta dif2::aad1; \Delta xerC::rif</i>	(1)
BS49	CVC301 (N16961 <i>StrR Pcp18 araE</i>); $\Delta lacZ \Delta dif1$ -prophages:: <i>ecJlacZa-dif1-lacZb; \Delta dif2::aad1; \Delta xerD::zeo</i>	This study
EPV366	N16961 $\Delta lacZ; ChapR \Delta dif1$ -prophages:: <i>aad1; LacZ::ecJlacZa-dif1-lacZb \Delta xerC::p_{ara}XerCD-Spec^R</i>	This study
CMV26	N16961; <i>ChapR; \Delta dif1-prophages::<i>ecJlacZa-dif1-lacZb-FRT-sh ble-FRT (Zeo^R); \Delta xerC::p_{ara}XerCD-Spec^R</i></i>	This study
BS50	CVC301 (N16961 <i>StrR Pcp18 araE</i>); $\Delta dif1$ -prophages:: <i>ecJlacZa-dif1-lacZb; \Delta dif2::aad1; XerD::XerDyF</i> catalytic mutant	This study
BS51	CVC301 (N16961 <i>StrR Pcp18 araE</i>); $\Delta lacZ, dif1$ -prophages:: <i>ecJlacZa-dif1-lacZb; \Delta dif2::aad1; XerC::XerCyF</i> catalytic mutant	This study
CMV01	N16961; $\Delta lacZ; ChapR; dif1$ -prophages:: <i>ecJlacZa-dif1-lacZb-FRT-sh ble-FRT (Zeo^R)</i>	This study
CMV13	N16961; $\Delta lacZ; ChapR; dif1$ -prophages:: <i>ecJlacZa-dif1-lacZb, XerC::p_{ara}XerC-Spec^R</i>	This study
CMV14	N16961; $\Delta lacZ; ChapR; dif1$ -prophages:: <i>ecJlacZa-dif1-lacZb, XerC::p_{ara}XerC-Spec^{R}; ftsk\Delta\gamma::sh ble (Zeo^R)}</i>	This study
CMV30	N16961; $\Delta lacZ; ChapR; dif1$ -prophages:: <i>ecJlacZa-dif1-lacZb, XerC::p_{ara}XerCD-Spec^{R}; \Delta XerD::sh ble (Zeo^R)}</i>	This study
CMV20	N16961; $\Delta lacZ; ChapR; dif1$ -prophages:: <i>ecJlacZa-dif1-lacZb, XerC::p_{ara}XerC-Spec^{R}; with suicide TLC-sacB}</i> integrated at <i>dif1</i>	This study
CMV21	N16961; $\Delta lacZ; ChapR; dif1$ -prophages:: <i>ecJlacZa-dif1-lacZb, XerC::p_{ara}XerC-Spec^{R}; ftsk\Delta\gamma::sh ble (Zeo^R);}</i> with suicide <i>TLC-sacB</i> integrated at <i>dif1</i>	This study
CMV36	N16961; $\Delta lacZ; ChapR; dif1$ -prophages:: <i>ecJlacZa-dif1-lacZb, XerC::p_{ara}XerCD-Spec^{R}; \Delta XerD::sh ble (Zeo^R);}</i> with suicide <i>TLC-sacB</i> integrated at <i>dif1</i>	This study
EPV158	N16961; $\Delta lacZ; ChapR; dif1$ and prophages:: <i>ecJlacZa-dif1-lacZb-FRT-sh ble-FRT (Zeo^R); with integrated</i> <i>pEP68 at dif1 (integration by attP^{CTX})</i>	This study
CMV34	N16961; $\Delta lacZ; ChapR; dif1$ -prophages:: <i>ecJlacZa-dif1-lacZb-FRT-sh ble-FRT (Zeo^R); with integrated</i> <i>pCM105 at dif1 (integration by attP^{CTX})</i>	This study
CMV35	N16961; $\Delta lacZ; ChapR; dif1$ and prophages:: <i>ecJlacZa-dif1-lacZb-FRT-sh ble-FRT (Zeo^R); with integrated</i> <i>pCM106 at dif1 (integration by attP^{CTX})</i>	This study
EPV361	N16961; $\Delta lacZ; ChapR; \Delta xerC::paraXerC-6HisXerD-SpecR}; \Delta xerD::FRT-sh ble-FRT (ZeoR)$	This study
EPV363	N16961; $\Delta lacZ; ChapR; \Delta xerD::6HisXerD$	This study



1. Das B, Bisserour J, Val M-E, Barre F-X (2010) Molecular keys of the tropism of integration of the cholera toxin phage. *Proc Natl Acad Sci USA* 107(9):4377–4382.

Table S4. Oligonucleotides

Oligo	Used for	Sequence
1266	Check CTX ϕ -Kn integration	CACGACGATTCACCTCAACCTTCC
1398	Check CTX ϕ -Kn integration	TTCGACGTTTCAGACGTAGTG
1940	<i>dif1</i> C* mutation	CGATAGTGCGCATTACCTATGTTATGTTAAATTAAT
1941	<i>dif1</i> C* mutation	CGATTAATTTAACATAACATAGGTAATGCGCACTAT
1942	<i>dif1</i> D* mutation	CGATAGTGCGCATTATGTACCTTATGTTAAATTAAT
1943	<i>dif1</i> D* mutation	CGATTAATTTAACATAAAGGTACATAATGCGCACTAT
1944	<i>attP^{TLC}</i> C* mutation	GGTAATGCGCACTAGGATC
1945	<i>attP^{TLC}</i> C* mutation	TATGTAGAGAAAGTGAAGAC
1946	<i>attP^{TLC}</i> D* mutation	GGTACATAATGCGCACTAGG
1947	<i>attP^{TLC}</i> D* mutation	TAGAGAAAGTGAAGACTACG
1878	TLC amplification on <i>N16961</i>	CCGTCTAGAGCTAGGAACATTTTGTCTCTAGG
1879	TLC amplification on <i>N16961</i>	CCGGATCCTAGTGCGCATTATGTATGTAGAG
1899	Check <i>attP^{CTX}</i> integrants	GTCTCGTTGCTGCATAAACC
2479	Check <i>attP^{CTX}</i> integrants	CCCGAGCTCTCAAAGCTCAGCCTCCTAC
477	Check <i>TLCϕ-CTXϕ</i> excision	CGCAGGCTTCTGCTTCAATC
1565	Check <i>TLCϕ-CTXϕ</i> excision	cggcgtttcatctgtggtgc
1297	<i>dif1</i> gel shift	ATCAGTGCGCATTATGTATGTTATGTTAAATGGA
1298	<i>dif1</i> gel shift	CTGTCCATTTAACATAACATAACATAATGCGCACTGAT
1958	<i>attP^{TLC}</i> gel shift	ACGTCTAGTGCGCATTATGTATGTAGAGAAAGTGGACGT
1959	<i>attP^{TLC}</i> gel shift	ACGTCCACTTCTCTACATAACATAATGCGCACTAGACG

2.3 Discussion de l'article

Nous avons démontré que TLC Φ exploite la machinerie Xer pour s'intégrer dans le chromosome bactérien aux sites *dif1* ou *difA*. L'étude des échanges de brins réalisés par les Xer au cours de la recombinaison définit TLC Φ comme appartenant bel et bien à une nouvelle catégorie d'IMEXs avec un mécanisme de recombinaison Xer spécifique. Ce mécanisme de recombinaison diffère de ceux décrits auparavant aussi bien pour les IMEXs, que pour la PMR et la CDR. Tous comme les IMEXs ou plasmides utilisant les recombinases Xer, TLC ϕ exploite un mécanisme de recombinaison indépendant de l'activation par FtsK et donc non contraint par le cycle cellulaire bactérien. Néanmoins, en opposition aux autres éléments, l'échange de brins est initié par XerD tout comme lors de la résolution des dimères de chromosomes qui, elle, nécessite FtsK.

2.3.1 Exploitation paradoxale de la machinerie Xer :

Les recombinases à Tyrosines XerC et XerD sont capables de catalyser un événement de recombinaison entre *dif1*/ou *difA* et *attPTLC* bien qu'*attPTLC* soit fortement affecté pour la fixation de XerD.

La seule recombinase à Tyrosine décrite et capable d'activité catalytique sous forme d'un complexe trimérique et sur des demi-sites est la flippase *Flp* de *Saccharomyces cerevisiae* [25]. Cependant ces événements de recombinaison sont possibles car le clivage de l'ADN par Flp est effectué en *trans*. Nous noterons néanmoins que les recombinases Cre et λ qui réalisent uniquement des clivages en *cis*, sont capables de résoudre des jonctions en Y appelées "three-way junctions YJ" et correspondant à trois demi-sites formant une jonction [162, 163]. Cependant résoudre une jonction déjà formée artificiellement est différent de former et recombiner une

synapse entre les différents sites substrats.

La synapse Xer est théoriquement similaire à une synapse Cre avec un clivage en *cis* [25, 23]. Les études structurales réalisées sur Cre et Flp, expliquent clairement les différences entre clivage *cis* et *trans*. Dans une synapse Flp, les recombinases actives donnent leur hélice αM à la paire de recombinases non actives. Cette même hélice contient la tyrosine catalytique qui va donc avoir une action en *trans* (voir Figure 2.3). Dans le cas des synapses similaires à Cre (et donc suspectées pour Xer), l'hélice contenant l'activité catalytique de la Tyrosine n'est pas celle donnée à la paire de recombinases inactive. Cette hélice (αM pour Cre) attaque en *cis*, l'ADN proche du site de fixation de la paire de recombinases actives [164, 25] (voir Figure 2.3).

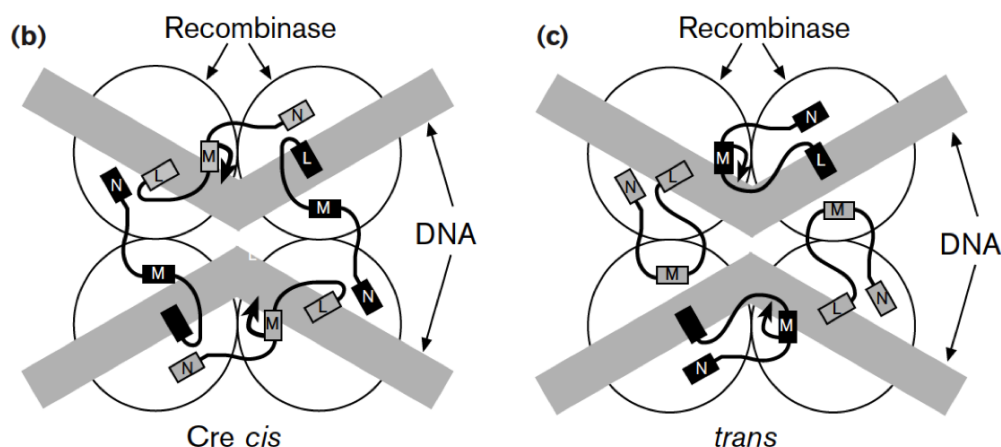


FIGURE 2.3 – Schéma de la structure synaptique représentant un clivage en *cis* ou en *trans* par la tyrosine catalytique. Seules les hélices αL , αM et αN du domaine C-terminal sont représentées. (b) : Cas d'un clivage en *cis* catalysé par Cre. L'hélice αN est donnée en *trans* à la sous-unité adjacente mais l'hélice αM qui contient la Tyrosine catalytique reste en *cis*. (c) : Cas d'un clivage en *trans* catalysé par Flp. Les hélices αL et αN restent en *cis* alors que l'hélice αM portant la Tyrosine catalytique est donnée en *trans*. Tirée de Gopaul D.N. et Duyne G.D.V. 1999 [164]

Nos essais utilisant des sites *attPTLC* mutés au niveau de la région

centrale démontrent que le clivage par XerD est réalisé aussi bien sur le site *dif* que sur le site *attPTLC*, donc que XerD est présent sur le site *attPTLC* au moment de l'échange de brins. Ces résultats suggèrent que la recombinaison implique un hétérotétramère de XerC et XerD. Nous avons également démontré que la surexpression de XerC et XerD augmente l'efficacité d'intégration de TLC Φ . Cela suggère alors que l'hétérotétramère se forme soit à une fréquence moins élevée soit est moins stable à cause des bases dégénérées.

2.3.2 Mécanisme d'échange de brins des IMEXs de type TLC Φ :

Nous avons démontré que lors de la recombinaison de *dif1* ou *difA* avec *attPTLC* le premier échange de brins est catalysé par XerD tout comme la résolution des dimères de chromosome. Mais par opposition à la CDR, XerD ne nécessite pas d'être activée par la protéine du divisome FtsK. L'intégration et l'excision de TLC Φ est spatialement et temporellement indépendante du cycle cellulaire. Deux principales hypothèses non exclusives l'une de l'autre peuvent expliquer l'activation de XerD au sein de cette synapse.

Hypothèse 1 : Le site *attPTLC* permet par lui même une conformation de synapse favorable à l'auto-activation de XerD. Le site étant dégénéré, la fixation de XerD sur *attPTLC* courbe différemment l'ADN par rapport à un site *dif1*. XerD serait dans une conformation plus favorable pour donner en *cis* son bras Cter à XerC. Cette hypothèse repose notamment sur les observations de Marie-Eve Val et al. en 2008 [31]. En utilisant des essais de recombinaison intraplasmidique cette équipe a démontré que XerD de *V. cholerae* possède une faible activité catalytique indépendante de FtsK. Des

mutations ponctuelles dans une séquence *dif1* modifient l'efficacité de cet évènement de recombinaison, suggérant que le site en lui même influence l'activation des Xer.

Hypothèse 2 : Un facteur accessoire du phage TLC Φ permet l'activation de XerD. Cette hypothèse repose sur le fait que le site *attPTLC* seul porté par un plasmide, ne suffit pas à la recombinaison *in vivo* (données non montrées dans l'article). Ce facteur accessoire pourrait également avoir un rôle dans la fixation de XerD sur le site *attPTLC*.

2.3.3 Mécanisme d'intégration indépendant de FtsK :

Tous les éléments mobiles piratant Xer décrivent jusqu'à présent utilisent une voie de recombinaison ne nécessitant pas l'intervention de FtsK pour activer XerD. Dans les cas de CTX Φ et VGJ Φ , XerC catalyse le premier échange de brins et la HJ ainsi formée semble être convertie en produit suite au passage de la fourche de réplication [138, 145, 135]. Pour les plasmides ColE1 et pSC101, la fixation des facteurs de l'hôte sur les sites *cer* et *psi* aboutie à la formation d'un filtre topologique qui force l'activation des recombinases et la directionnalité de la réaction [115, 124, 165, 33]. Enfin pour TLC Φ , XerD semble être actif dans la synapse tout comme pour les sites *cer*, mais il est peu concevable d'imaginer un filtre topologique agissant en intermoléculaire pour l'intégration. TLC Φ possède donc sûrement une autre stratégie d'activation de XerD.

Dans cet article nous avons démontré que l'intégration de TLC Φ ne dépendait pas de FtsK par deux techniques différentes. La première fut d'effectuer les essais d'intégration dans une souche mutante n'exprimant plus le domaine γ de FtsK qui est nécessaire à l'activation de XerD. La seconde fut de regarder l'excision d'une cassette "*attPTLC*-génomme partiel

de TLC- *dif1* " au locus *lacZ* (éloigné du Ter) ou au locus *dif1*. Avec les deux approches nous avons démontré que TLC s'intègre et s'excise à la même fréquence ; que FtsK "voit" ou non la synapse *attPTLC/dif1*.

Lors des essais d'intégration de TLC Φ en fond génétique $\Delta\gamma$ FtsK, nous avons remarqué une mortalité. Les colonies obtenues sur boîtes sont petites, présentent de la lyse, et sont variables en nombre aussi bien d'une expérience à l'autre que d'une dilution à l'autre. Ce phénotype est visible si nous n'utilisons pas de souches inductibles pour l'expression des Xer ou réalisons les essais sur plus de 4h. J'ai alors réalisé une cinétique en utilisant des souches inductibles ou non pour l'expression de XerC et délétées ou non pour le domaine γ de FtsK.

J'ai suivi la perte de pTLC au cours du temps, en comparant le nombre de bactéries résistantes à l'Ampicilline (gène de résistance *bla* porté par pTLC) par rapport au nombre total de bactéries (voir Figure 2.4). Au temps zéro, les cultures faites sur la nuit sont diluées et l'induction en arabinose est réalisée. On remarque que les souches non inductibles pour XerC et $\Delta\gamma$ FtsK (orange) sont affectée avant le T0 alors que leur équivalent inductible pour XerC (rouge) maintiennent le plasmide et aucune léthalité n'est détectée. Cependant 4h post-induction les souches inductibles pour XerC et $\Delta\gamma$ FtsK commencent à perdre le plasmide.

Cette mortalité ou perte du plasmide n'est pas directement liée au phénotype connu pour les mutants FtsK et les dimères de chromosomes. Travailler en fond génétique $\Delta recA$ ne restaure pas le phénotype et utiliser le mutant $\Delta Cter$ FtsK donne le même résultat. Cette toxicité ou instabilité semble liée à la capacité d'intégration du phage TLC ϕ . Elle n'est plus observée, avec un mutant $\Delta xerC$; en absence d'expression des Xer ; avec un mutant $\Delta attPTLC$ pour le phage ou après intégration du phage dans le

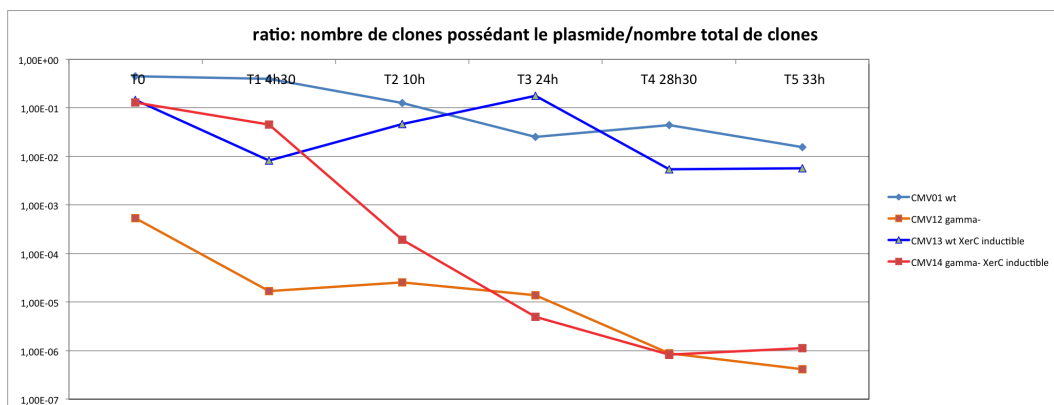


FIGURE 2.4 – **Cinétique de perte du plasmide intégratif-TLC au cours du temps.** Les souches ayant reçu le pTLC ont été mises en culture sur la nuit en présence d’IPTG 0.2mM +Amp (gène *bla* présent dans plasmide). Au temps T0, les cultures sur la nuit ont été diluées dans du LB sans antibiotique, et l’expression des Xer a été induite avec 0.2% d’Arabinose. Aux temps indiqués, les cultures ont été rediluées au 100ème en LB et différentes dilutions ont été étalées sur des boîtes LB-Agar + ou - Amp. Les conditions de cultures ont été réalisées à 37°C.

génomique (les clones blancs se développent normalement sur boîte) (données non montrées).

Enfin il serait possible d’imaginer que le plasmide multimériser par recombinaison entre deux sites *attPTLC* de manière XerCD dépendante et que FtsK soit requis pour résoudre ces multimères. Mais aucun événement de recombinaison n’a pu être détecté *in vivo* lorsque nous avons remplacé le site *dif1* du chromosome par un site *attPTLC* (données non montrées). Ces résultats suggèrent que l’intégration de TLC Φ crée un problème dans la bactérie qui peut être résolu par FtsK.

De manière surprenante les souches de *V. cholerae* codant pour des mutants catalytiques XerDYF ou XerCYF ne présentent pas ce phénotype alors que TLC peut toujours s’intégrer avec XerCYF (voir résultats article Figure 1B). Il est suspecté que les mutants catalytiques YF des Xer soient affectés pour la liaison aux sites de recombinaison. On note d’ailleurs une légère diminution de l’efficacité d’intégration de TLC ϕ avec le mutant Xer-

CYF mais pas en utilisant un site *attPTLCC**. Il est donc possible qu'il y ait un lien entre la légère altération de fixation de XerCYF et le fait que la toxicité liée à l'intégration de $TLC\phi$ ne se présente pas avec le mutant XerCYF.

2.3.4 Contribution de $TLC\Phi$ dans l'évolution des souches toxigéniques :

La plupart des études visant à comprendre l'évolution : de la toxine cholérique, du variant $CTX\Phi$ présent dans les souches pandémiques et des réarrangements d'IMEXs intégrés au site *dif*, reposaient sur la recombinaison homologue. Un évènement de recombinaison homologue entre un $CTX\Phi$ intégré et un prophage $RS1\Phi$ qui possèdent une importante homologie de séquence avec $CTX\phi$, pourrait permettre de supprimer des copies de $CTX\Phi$. Cependant l'excision serait incomplète et imprécise.

La souche B-33 du Mozambique présente la particularité d'être génétiquement identique à la souche pandémique O1 El Tor N16961, mais diffère au niveau de la composition en IMEXs (voir Figure 2.1) [158]. Premièrement cette souche possède le variant classique de $CTX\Phi$ présent normalement dans les souches classiques de *V. cholerae*. De plus elle ne possède aucune copies de $TLC\Phi$ ni de $RS1\Phi$, ce qui suggère qu'un précurseur de cette souche a perdu la totalité des IMEXs intégrés et a acquis un variant $CTX\Phi_{class}$ sur le chromosome II. Le seul moyen d'exciser la totalité des IMEXs par recombinaison homologue, serait d'obtenir un évènement de recombinaison homologue sur une région de 18 paires de bases (séquence $ER = CCTAGT\underline{GCGCATTATGT}$), ce qui est supposé être un évènement rare sur une si petite région d'homologie (voir Figure 2.5) [158]. Nous remarquerons que les bases soulignées dans cette séquence de 18 paires de

bases, correspondent au bras de fixation de XerC dans le site *dif1*.

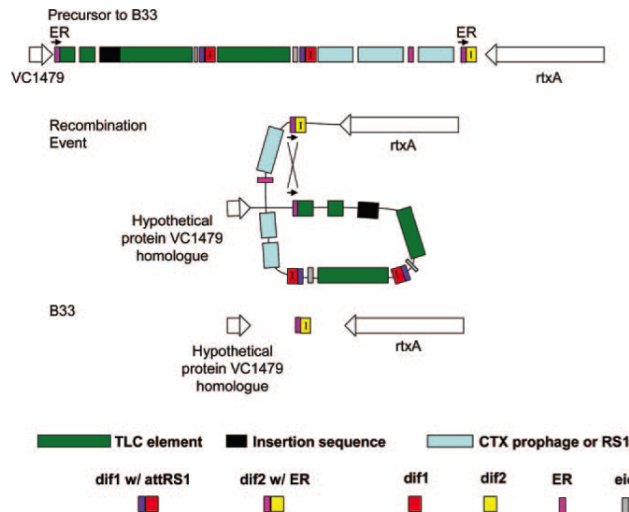


FIGURE 2.5 – Proposition d'évènement de recombinaison ayant conduit à la délétion de la totalité des IMEXs présent sur la chromosome I de *V. cholerae*. Précurseur putatif de la souche pandémique B33 du Mozambique : Notons que la légende de leur figure peut être mal interprétée. Ce qu'ils nomment comme *dif1* et *dif2*, sont ici les différentes parties d'un même site *dif* initial de la souche. Après intégration de phage ils sont séparés car faisant partie des sites *attL* et *attR*. ER = end repeat, eio = element-intervening ORF. D'après Faruque et al. [158]

Cependant lors de cette étude en 2007 la dynamique de $TLC\Phi$ et sa catégorisation en temps qu'IMEX n'était pas clairement établie. Nos résultats de co-excision $TLC\Phi$ - $CTX\Phi$ suggèrent que l'excision Xer dépendante de $TLC\Phi$ conduit à l'élimination de tous les IMEXs du chromosome I intégrés après lui-même. L'excision de $TLC\Phi$ pourrait donc conduire à un cas comme celui de la souche B-33. Dans les conditions de laboratoires testées, nos fréquences d'excision de $TLC\Phi$ conduisant à la perte de $CTX\Phi$ étaient 10 fois plus importantes que la perte par d'autres évènements de recombinaison imprécis (voir Table S2 de l'article). Cet aspect pourrait être facilement critiqué en argumentant que nous avons travaillé avec un

système artificielle où XerC et XerD de *V.cholerae* étaient surproduites, et que l'utilisation du gène de contre sélection *sacB* que nous avons utilisé pour repérer les excisant peut interférer avec l'excision. Cependant, en 2014 *M. Kamruzzaman et al.* [160] ont proposé qu'une superinfection par RS1 Φ conduit à la perte de copies intégrées de CTX Φ de manière *recA* dépendante. Dans leur table 3 reflétant leurs excisions de CTX Φ , (voir Figure 2.6) nous remarquons que dans 5 cas sur 11 la perte de CTX Φ coïncide avec celle de TLC Φ . Ces données suggèrent que l'excision de TLC Φ n'est pas le seul fait de notre essai.

TABLE 3 Characteristics of nontoxigenic derivatives of El Tor strains produced by RS1 phage-mediated excision of CTX prophage^a

Parent strain	Presence of genetic region in parent strain				Presence of genetic region in the nontoxigenic derivative				Designation of the derivative
	CTX	RS1	TLC	<i>rtxA</i>	CTX	RS1	TLC	<i>rtxA</i>	
MG-116926	+	-	+	+	-	-	-	+	SF2
MG-116226	+	+	+	+	-	+	+	+	SF3A
	+	+	+	+	-	-	+	+	SF3B
AR-02214021	+	+	+	+	-	-	-	+	SF2002
AI-1836	+	+	+	+	-	-	-	+	SF93
AK-17334	+	+	+	+	-	-	-	+	SF95
G-7555	+	+	+	+	-	+	+	+	SF20011
	+	+	+	+	-	-	-	+	SF20012
G-3985	+	+	+	+	-	-	+	+	SF69-2
P-27457	+	+	+	+	-	+	+	+	SF20016
	+	+	+	+	-	-	+	+	SF20019

^a The presence of different genes was detected using DNA probes and PCR assays. Selected strains were sequenced to confirm deletion events and identify the junctions.

FIGURE 2.6 – **Table d'excision des IMEXs lors de la surexpression de la réponse SOS.** D'après Table 3 de *M. Kamruzzaman et al.* [160]

Enfin les travaux de *Das et al.* proposèrent en 2011 que l'excision de VGJ Φ par recombinaison Xer pouvait co-exciser CTX Φ s'il s'était intégré après lui. Cependant les IMEXs de type VGJ Φ ont rarement été trouvés intégrés en amont de CTX Φ dans les génomes de souches de *V. cholerae*.

Chapitre 3

Résultats partie II : Facteur d'intégration de TLC (article en préparation)

Dans la seconde partie de ma thèse j'ai recherché et étudié le ou les facteurs de TLC ϕ permettant son intégration dans le génome de *V. cholerae* au site *dif1*. Les résultats présentés dans ce chapitre sont en cours d'écriture pour être soumis à publication.

3.1 Contexte ayant conduit à la recherche de facteurs d'intégration

Lors des essais d'intégration *in vivo* de TLC ϕ au site *dif1* du chromosome I de *V. cholerae* nous avons remarqué qu'en opposition au cas de CTX ϕ , un plasmide contenant uniquement le site *attPTLC* n'est pas capable de s'intégrer à *dif1* (voir pBS89 Figure 1A de l'article en préparation). Ces résultats suggèrent que le site *attPTLC* n'est pas suffisant et qu'un autre facteur présent sur TLC ϕ permet l'intégration. La nature de ce facteur est cependant inconnue. Il pourrait s'agir d'une séquence ADN servant de site de fixation pour des protéines de l'hôte ou du phage, et

qui serait impliquée dans une structure secondaire et/ou bien une protéine codée par le génome de $TLC\phi$. Dans le cas du phage λ par exemple le site $attP$ est accompagné de séquences accessoires, contenant 16 sites de fixation des protéines de l'hôte IHF, Xis et Fis. En cas d'intégration la fixation d'IHF sur les séquences accessoires crée une structure ADN environnant le site $attP$ qui est propice au mécanisme d'intégration. Cependant en cas d'excision et donc de recombinaison en intramoléculaire la synapse est de structure différente puisqu'à présent les trois protéines Xis, Fis et IHF interviennent sur les séquences accessoires [166]. La directionnalité de la réaction de recombinaison peut donc être imposée par des séquences et protéines accessoires même en cas de recombinaison en intermoléculaire.

3.2 Papier en préparation

Auteurs : Caroline Midonet, Evelyne Paly et François-Xavier Barre.

Introduction

Integrative mobile genetic elements as integrons, lysogenic phages and genetic islands, are often found in bacterial chromosome and their function or contribution in to the fitness of their host can be masked or not well understood (cryptic element). Most of them possess their own integrase allowing the recombination between a site present in their genome ($attP$) and a site present in the host genome ($attB$). Each integrative element specify his cognate $attB$ site. In contrast some mobile genetic elements that do not encode for integrase, hijack XerC and XerD recombinases of the host (IMEX for Integrative Mobile Element using Xer)[136]. Thus, the IMEX co-exploit the same $attB$ site, *dif*, generating interactions between

them.

XerC and XerD are two related tyrosine recombinases encoded in the genome of most of bacteria and which are involved in chromosome dimer resolution (CDR) by adding a crossover at the specific *dif* site [167, 31, 58, 14]. XerCD machinery is almost ubiquitous among bacteria and well conserved, therefore is an advantageous target for IMEXs [11, 31]. For CDR, XerCD recombination occurs in a synaptic complex implicating two *dif* sites, each of them loaded by one XerC and one XerD. During the recombination process, each pair of recombinase catalyse sequentially a strand exchange. However, in absence of accessory factor, no CDR can be allowed: 1) XerD is inactive while XerC can perform a first strand exchange at low efficiency leading to highly reversible Holliday junction (HJ) [44, 168, 96, 95]. To allow CDR, XerD needs to be activated by the division protein FtsK which constitute a cycle control [94, 82, 169, 62]. Then, the HJ can be resolved by XerC and the dimeric chromosome is converted into two monomeric chromosomes; in other words, one chromosome is excised from the other.

The IMEXs have evolved strategies, independent of the FtsK control, to remain stably maintained at *dif* and not be seen as dimeric chromosomes. Some exploit the XerC-first pathway through different mechanisms to integrate as CTX and VGJ and some use a pathway starting with XerD as TLC [7]. CTX ϕ , the first IMEX described, is a filamentous phage encoding for the cholera toxin that is one of the major factor of pathogenicity of *Vibrio cholerae*, the bacterium responsible for cholera disease [152, 130]. It integrates as a single stranded DNA form as the *attP* site is generated by annealing two different regions of its single stranded genome [135]. The CTX *attP* site cannot allow the XerD strand exchange and the pseudo-HJ

formed by XerC with *dif* is stable enough to be encountered by the replication forks [138]. This pseudo-HJ is also stabilised by EndoIII a host factor [139]. As the attachment site is masked after double strand conversion its excision is impossible but extrachromosomal copies can be produced by rolling circle replication between two tandemly repeated copies integrated at the chromosome. In the case of VGJ ϕ , the genome integrates as double stranded DNA and whereas the two strand exchanges are possible, the first exchange is catalysed by XerC [145]. The mechanism allowing this recombination pathway was not studied. In this case, while stably maintained in the population, VGJ ϕ can excise his genome or the group of IMEX genome present between VGJ and the *dif* site, in particular allowing the excision of CTX. The CTX-VGJ particules can be packaged by capsid proteins of VGJ ϕ increasing the dissemination of CTX [144]. Indeed, the toxin co-regulated pilus (TCP) classically used for CTX ϕ adsorption is expressed only in intestinal conditions whereas VGJ ϕ use the mannose-sensitive hemagglutinin (MSHA) pilus that is constitutively expressed by *V.cholerae* [170].

A third type of IMEXs with the first example recently characterized is the toxin linked cryptic element (TLC). TLC type of IMEXs have the particularity to carry an *attP* site with degenerated sequence in the XerD binding arm compare to the consensus sequence. In the case of TLC only 3 out of 11 bp remained compare to the targeted *dif* site (see Figure 3.1), which alters XerD binding in this region [30].

Nevertheless TLC ϕ was the first mobile element described that exploits XerD first exchange and without requiring FtsK activation despite a highly degenerated sequence in XerD binding arm compared to the consensus sequence [30]. TLC is a satellite phage found integrated in most of the pathogenic *V.cholerae* strains at a position suggesting that its acquisition

```

dif1      5'- AGTGCGCATTA TGTATG TTATGTTAAAT
           TCACGCGTAAT ACATAC AATACAATTTA -5'

attPTLC  5'- AGTGCGCATTA TGTATG TagaGaaAgtg
           TCACGCGTAAT ACATAC AtctCttTcac -5'

```

FIGURE 3.1 – **Alignment of *dif1* site and *attPTLC* site.** Bases in blue and minus indicate bases that differ in *attPTLC* compare to *dif1* targeted site.

preceded the acquisition of CTX [147, 148]. The excision of TLC will lead to remove all the IMEXs integrated after it, hence resetting the *attB* site for new IMEX combination [30]. Here, we studied the mechanism allowing TLC integration deciphering how the XerD exchange becomes independent and insensitive to FtsK. Thus, we identified and characterised a TLC encoded factor activating XerD via direct interaction and allowing to overcome the degenerated XerD binding site of TLC.

Results

TLC ϕ genome encodes a factor necessary for its integration

During the study of TLC recombination pathway [30], it was noticed that a plasmid containing only the attachment site *attPTLC* could not integrate in *V. cholerae* strains suggesting the requirement for an additional element of the TLC phage. In order to identify this element, different truncated forms of TLC were constructed and tested in an integration assay previously developed (3.2, mat and meth [30]). To this aim we amplified by PCR TLC genome from N16961 genomic DNA of *V. cholerae* strain and cloned it into a pSW23T vector containing *cat* resistance gene, an *oriT* for

conjugation and conditional origin of replication R6K that requires λ *pir* system. To avoid any replication of TLC ϕ by rolling circle we introduced a nonsense mutation into the gene *cri* encoding replicase (see Mat and meth). The plasmid carrying the full version of TLC with a point mutation inactivating TLC replicase was used as reference for the integration efficiency (see pBS126 Figure 1B). In the integration assay we conjugated TLC-plasmids (pTLC) from *E.coli* β 2163 strain containing λ *pir* system to *V.cholerae* strain where it does not replicate. The only way for recipient cells to acquire the resistance to chloramphenicol would be to integrate pTLC.

As previously published this system does not interfere with IMEXs integration [145, 138, 139]. In order to check the specificity of integration at *dif1* site, we used a colorimetric assay based on the disruption of *lacZ* due to the integration of the tested plasmid in a *dif1* site placed within the coding sequence of the *lacZ* gene. The endogenous *V.cholerae lacZ* gene and the genomes of integrated IMEXs were deleted by natural transformation. In absence of integration events, the colonies become blue on X-Gal plate. Integration of TLC ϕ disrupts the *lacZ-dif1* ORF and leads to colonies that remain white on LB-agar Xgal plates.

As observed previously, no integration was detected using the plasmid pBS89 corresponding to the vector carrying only the *attPTLC* site. Similarly, no integration was detected with pCM1, pCM7, pCM8, pCM9 but plasmids pCM10, pCM31, pCM32 and pCM33 led to integration at a frequency between 10^{-3} and 10^{-4} . In the case of pCM33 almost all the genome of TLC was deleted without affecting integration abilities. Only the regions carrying the end of ORF VC1467, ORF VC1466, ORF VC1465, *attPTLC*

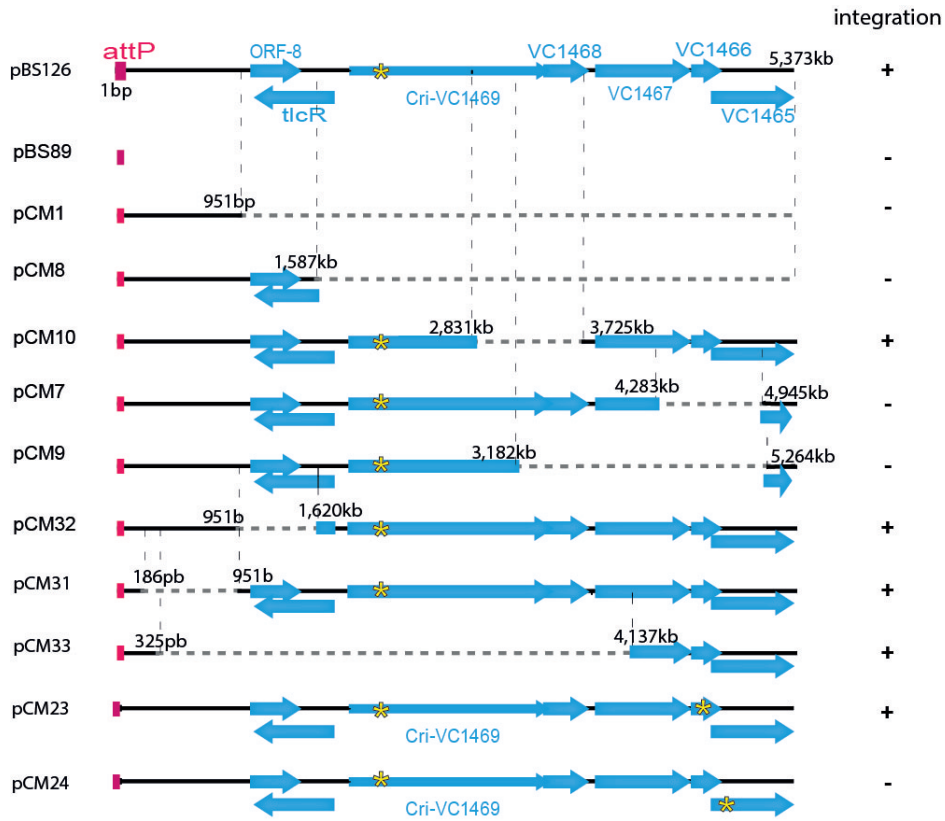


FIGURE 3.2 – **Schematic linear representation of deletions made in TLC genome.** Blue arrows indicate ORF and their orientation. *attPTLC* : magenta square. Continuous black line : dsDNA, dotted line the region deleted with positions indicated by numbers. Yellow star marked punctual nonsense mutation. + : integration frequency between 10^{-3} and 10^{-4} on 3h, - : integration is below the level of detection estimated at 10^{-6} .

and a fraction of the adjacent region of *attPTLC* were still present (see Figure 3.2). However in pCM7 that does not integrate the end of VC1467, VC1466 and half of VC1465 sequences are deleted. These results suggested that either this region contains a DNA sequence important for integration or VC1466 and/or VC1465 encodes a protein necessary for integration or both. To test the requirement of the product of either VC1466 or VC1465, we introduced a nonsense mutation in ORF VC1466 and VC1465 to obtain pCM23 and pCM24 respectively. Only pCM24 was affected for integration,

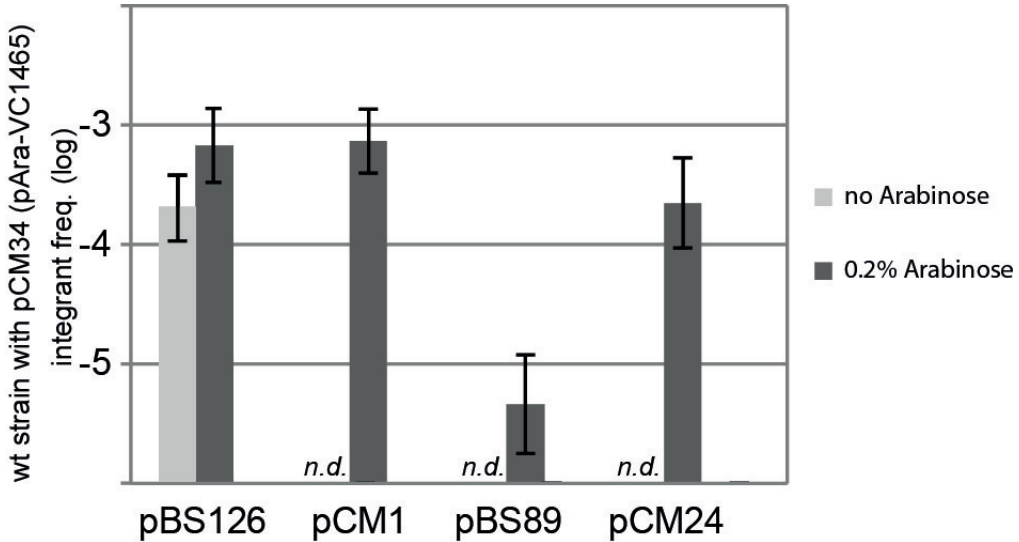


FIGURE 3.3 – Complementation *in trans* with VC1465 under *pAra* promoter. n.d. : not detected. Induction was performed with 0.2% of arabinose.

as no integrants were detectable (see Figure 3.2). To eliminate the possibility of any polar effect due to the mutation and confirm the hypothesis of a protein encoded by VC1465, we build a plasmid for complementation *in trans* with VC1465 under *pAra* promoter. We tested the integration of pCM1, pCM24 and pBS89 with or without induction of VC1465 with 0.2% arabinose. Expression of VC1465 *in trans* complements fully the integration of pCM24 and pCM1 but partially pBS89 (see Figure 3.3). These results suggest that the ORF VC1465 is a gene encoding for a protein implicated directly or indirectly in the integration process of TLC ϕ .

The protein encoded by VC1465 was predicted to encode for a putative DNA binding protein. This protein that we decided to call XafT (Xer activator factor of TLC) is 194 aa sized and contains two predicted domains. The first one in Nter is a HTH domain from the XRE (Xenobiotic Response Element) family that are often transcriptional regulators. The second one

is a domain of unknown function DUF3653 located in Cter and found in some proteins of phages. Interestingly research of DUF3653 domain in UniProt and Pfam databases leads to IMEXs from TLC type integrated into the genome of bacteria like *Nitrosomonas*, *Xanthomonadales*, *Vibrios* and *Xylllela*.

XafT is sufficient to activate Xer recombination between *attPTLC* and *dif1* *in vitro*

To investigate the role of XafT, the *attPTLC/dif1* recombination was tested *in vitro* in presence or absence of this factor. The *attPTLC* fragment was a 152bp linear fragment containing *attPTLC*, TLC sequence on XerD side and R6K backbone on the XerC side and the *dif1* fragment was a linear fragment of 34bp *dif1* site labelled with each strand labelled either by Cy3 or by Cy5. The recombination reaction was performed using 1pmol of labelled *dif1* and 2pmol of non-labelled *attPTLC* fragment. And with an excess of purified XerC, XerD and VC1465 during 2h before treatment with proteinase K to remove proteins from DNA (see Mat. and meth.). Each reaction samples were run in acrylamide gel to separate the different fragments. In absence of recombination, the only detectable fragment should be the dually labelled *dif1* fragment. In case of HJ formation, both fluorophores should be associated with a product of higher size. If the complete reaction with two exchanges occurs, two products of different sizes should be formed : one labelled with Cy3 and the other labelled with Cy5. As expected, in the absence of any protein neither product nor HJ were observed (see Figure 3.4). The same result was obtained with only XerCD or XafT. In presence of the three proteins together, a small fraction of the substrate was recombined generating mainly HJ and a small fraction of few complete products. These results suggest that XafT activates XerCD

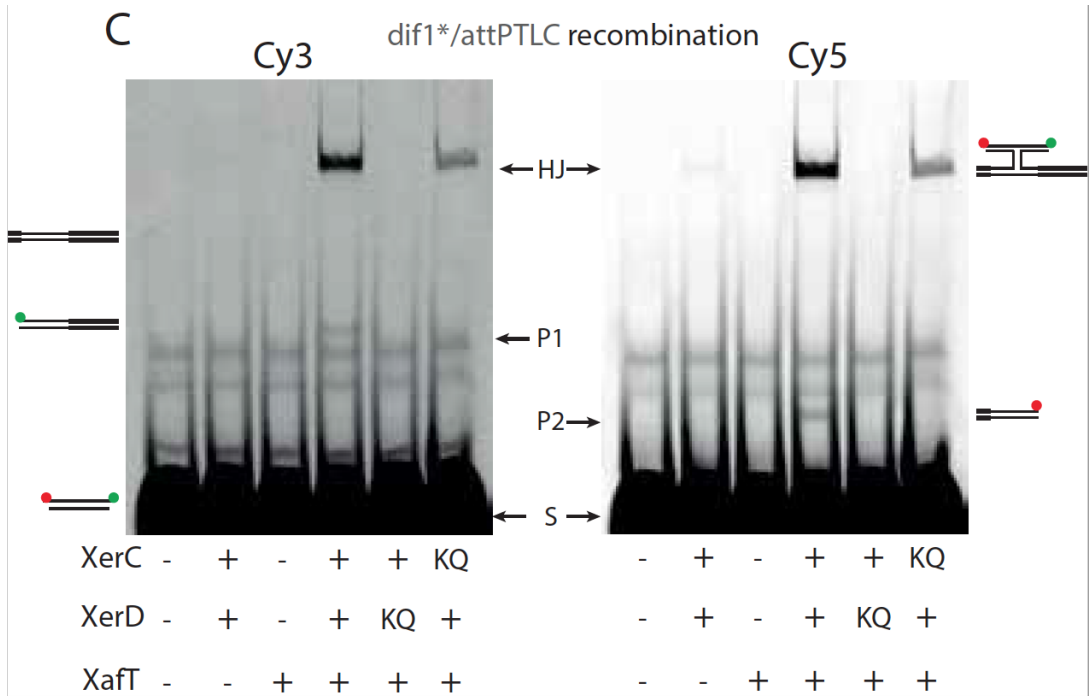


FIGURE 3.4 – *in vitro* recombination between *attPTLC* and *dif1*. (+) and (-) signs indicate proteins added. KQ : catalytic mutant. HJ : Holliday junction. P : products 1 and 2. S : substrat. red and green circles represent Cy3 and Cy5 fluorophores respectively. * = labelled DNA with both Cy3 and Cy5.

recombination *in vitro*. No additional factor seems to be required.

In order to test if the recombination obtained *in vitro* is the same than the one studied before *in vivo*, we used catalytic mutants of XerD (XerDKQ) and XerC (XerCKQ) to analyse the pathway of integration [29]. No recombination can be detected with XerDKQ while the recombination is blocked at the HJ step with XerCKQ. This confirm that XerD initiates the first strand exchange to form an HJ resolved by XerC as observed in Midonet et al. [30]. This reaction is able to activate XerD independently of FtsK gamma domain.

XafT activates recombination between two *dif1* sites

As reported previously, modifications in *dif1* sites can modify the requirement of XerD to be activated [31]. We wondered if the degenerated XerD binding site of *attPTLC* could be important for the activation by XafT. To answer to this question we replaced *attPTLC* by *dif1* in pCM33 and tested it in the *in vivo* integration assay. Plasmid carrying *dif1* integrates independently of FtsK into *dif1* site in presence of XafT (data not shown).

Then we performed the same assay *in vitro* as previously described and with the same fragment of DNA but replacing *attPTLC* by *dif1*. The results were similar (see Figure 3.5). Recombination occurs only in presence of the three proteins leading mainly to HJ but also to full products. The efficiency seems slightly higher than with *attPTLC*. In this case, the recombination is similar as with *attPTLC* : XerD initiates the first strand exchange while XerC resolves HJ into product. We concluded that XafT can also activate recombination between two *dif1* sites.

Activation does not require accessory sequences *in vitro*

We noticed that XafT complements poorly a plasmid carrying only *attPTLC* without any additional sequences of TLC (see Figure 3.3). To determine whether any accessory sequences could be required we used different *attPTLC* fragment in our *in vitro* recombination assay. Using a shorter fragment of *attPTLC* where no TLC adjacent sequence remains, we observed that the recombination *in vitro* was not affected (see Figure 3.6). No P1 products can be seen on the gel when using the fragment without DNA on XerD binding side because the product P1 has the same size than the substrate.

XafT is a putative DNA binding protein. In order to test if its role in

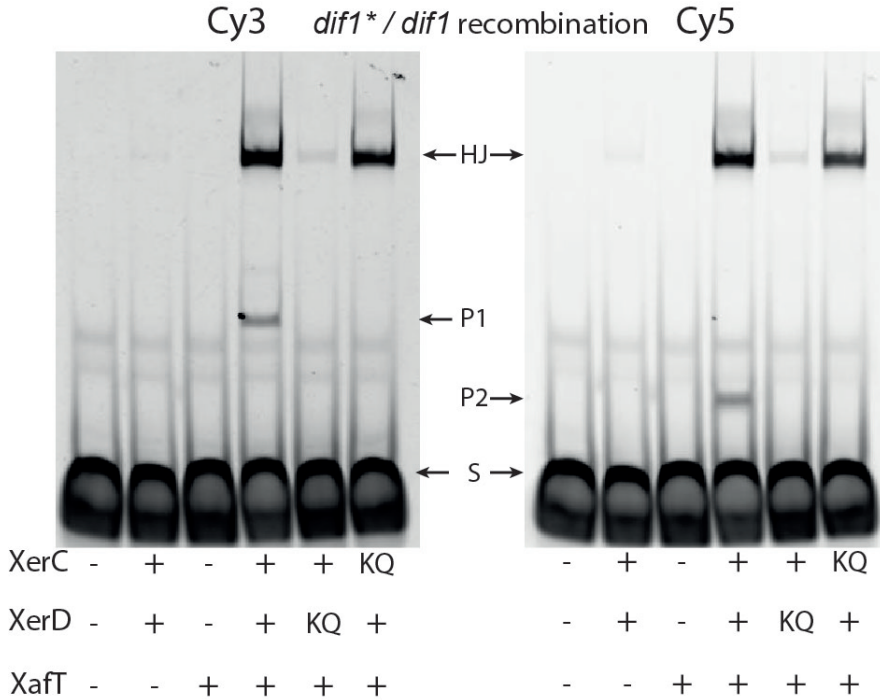


FIGURE 3.5 – *In vitro* recombination between two *dif1* sites. (+) and (-) signs indicate proteins added. KQ : catalytic mutant. HJ : Holliday junction. P : products 1 and 2. S : substrat. *= labelled DNA with both Cy3 and Cy5.

activation requires any flanking DNA sequence, we used a 31bp *dif1* site without flanking DNA on the XerC binding side (3bp) and with various length of DNA sequence on the XerD side (see Figure 3.7).

We decided to use recombination between two *dif1* sites as recombination efficiency was better and we knew that TLC DNA is not required for *attPTLC* recombination with *dif1*. The sizes of 28bp, 25bp, 20bp, 15bp, 10bp and 5bp were tested. After *in vitro* recombination samples were put under migration on a sequencing gel. Because of denaturation properties of sequencing gels no HJ can be observed. The size of the fragment resulting from any exchange will inform us on recombination, nevertheless it would be impossible to distinguish between HJ and full product forma-

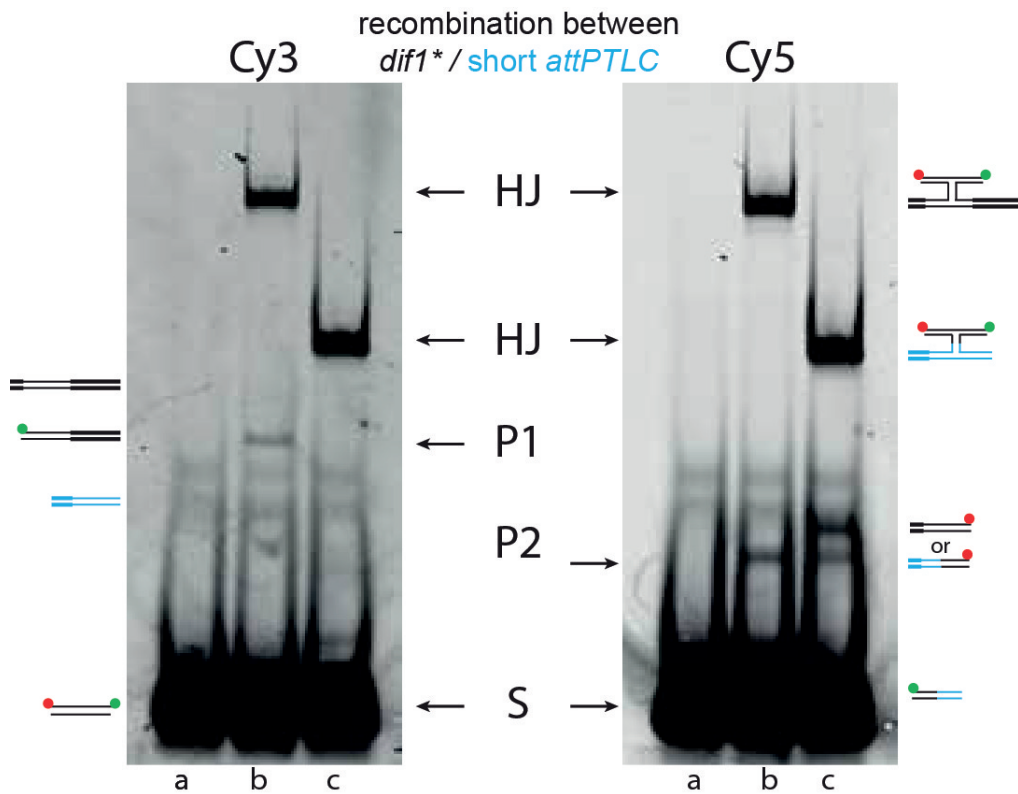


FIGURE 3.6 – recombination between *attPTLC* and *dif1* when removing TLC genome on XerD side. a : *dif1/attPTLC* fragment of 152bp without XafT, b : recombination *dif1/attPTLC* fragment of 152bp with XafT, c : recombination *dif1/attPTLC* fragment without TLC DNA on XerD side and with XafT. Scheme depicting substrats and products are represented. blue lines indicate short *attPTLC* case.

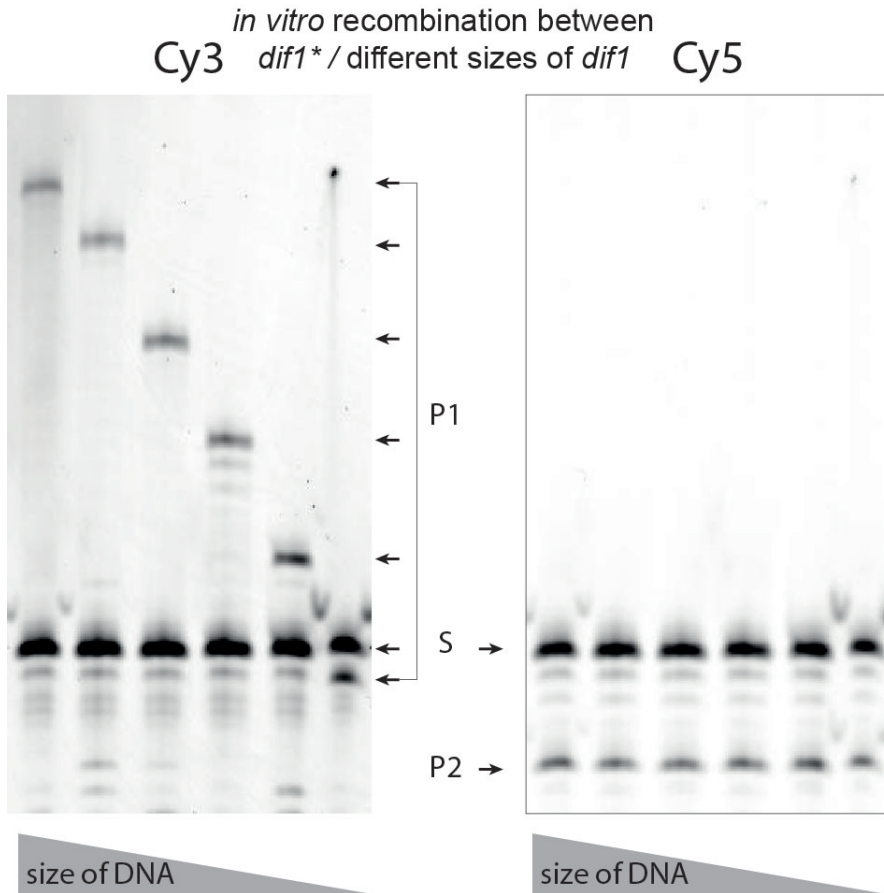


FIGURE 3.7 – sequencing gel of *dif1/dif1* recombination while reducing the size of non-labelled substrate. HJ : Holliday junction. P : products 1 and 2. S : substrat. *= labelled DNA with both Cy3 and Cy5. Tested lengths on XerD side : 28bp, 25bp, 20bp, 15bp, 10bp, 5bp. Only 3bp were added on the XerC binding side.

tion. After recombination (HJ or product), the size of fragments labelled with Cy5 fluorophore should always be the same (P2) while the size of fragments labelled with Cy3 should vary with the size of the substrate (P1). Fluorophores Cy3 and Cy5 interfere with migration of DNA along electrophoresis. On classical gel no distinction can be made but in sequencing gels DNA with 2 fluorophores migrates slightly slower than DNA with one fluorophore. This property explains why with the shortest substrate, the product Cy3 with 5bp on XerD side, migrates below the substrate (that contains 3bp on XerD side) while it was expected to be slightly upper. In all the tested conditions with different sizes we were able to see activation of recombination. As the shortest substrates of *attPTLC* (36bp) recombine with a short *dif1* sites (34bp) we assumed that no DNA (except the *dif1* site) is required for activation of XerD through XafT and that action of XafT could be mediated by direct interaction with Xer recombinases.

XafT interacts directly with XerD

In order to test the interactions between XafT, XerC and XerD recombinases we used purified proteins MBP-XerD, MBP-XerC and XafT in an *in vitro* pull down assay. To this aim amylose covalently coupled with paramagnetic beads were incubated with 1 μ M of MBP-Xer, 1 μ M of negative control MBP-136 (a protein encoded by the phage VGJ) or/and 2 μ M of XafT in the same buffer than *in vitro* recombination complemented with Triton 1X. After incubation and washes, samples were run on acrylamide gels. A slight band is observed in presence of non-tagged XafT alone, indicating that the protein sticks a little to the beads. As expected MBP-XerC, MBP-XerD and MBP-136 bind to beads through their MBP tag and can be efficiently recovered in this pull down assay (Fig 3.8A). When incubating XafT with MBP-XerD, it allows to enrich the recovery of XafT ; about 2.5

more than the non specific recovery (XatT alone, lane1). In contrast, using MBP-XerC or MBP-136 (as negative control), the recovery of XafT was not enriched compared to the recovery in absence of any MBP protein to pull down (see Figure 3.8 A and B). As these experiments were performed with purified proteins, it suggests that XafT interacts directly and specifically with XerD.

XafT increases the cooperativity of XerC and XerD binding to the *attPTLC* site

Our assay demonstrated that XafT activates efficiently recombination between *attPTLC* and *dif1*, *in vivo* and *in vitro* despite the degenerated XerD binding site. As XafT interacts with XerD we wonder if XafT could increase the affinity of XerD for *attPTLC* site. Unfortunately we were unable to see any effect of XafT on XerD binding in gel shift assay and when we use the three proteins together, the complexes migrated in the wells (data not shown).

We then proposed that XafT could increase the cooperation for binding between XerC and XerD on *attPTLC* site. To test this hypothesis, we looked at XerD retention in *in vitro* pull down assay of MBP-XerC, and supplemented with XafT and *attPTLC* or *dif1* (see Figure 3.9 and 3.10).

First we noticed that purified XerD sticks aspecifically to the beads. No significant enrichment of XerD in presence of MBP-XerC meaning that interactions between both in absence of DNA are poor. A slightly but not significant increase was obtained when adding MBP-XerC and *dif1* site indicating that even on a *dif1* site the cooperation for binding is weak in our conditions. XafT does not increase XerD recovering in absence of DNA. A significant enrichment of XerD is obtained when using both MBP-XerC,

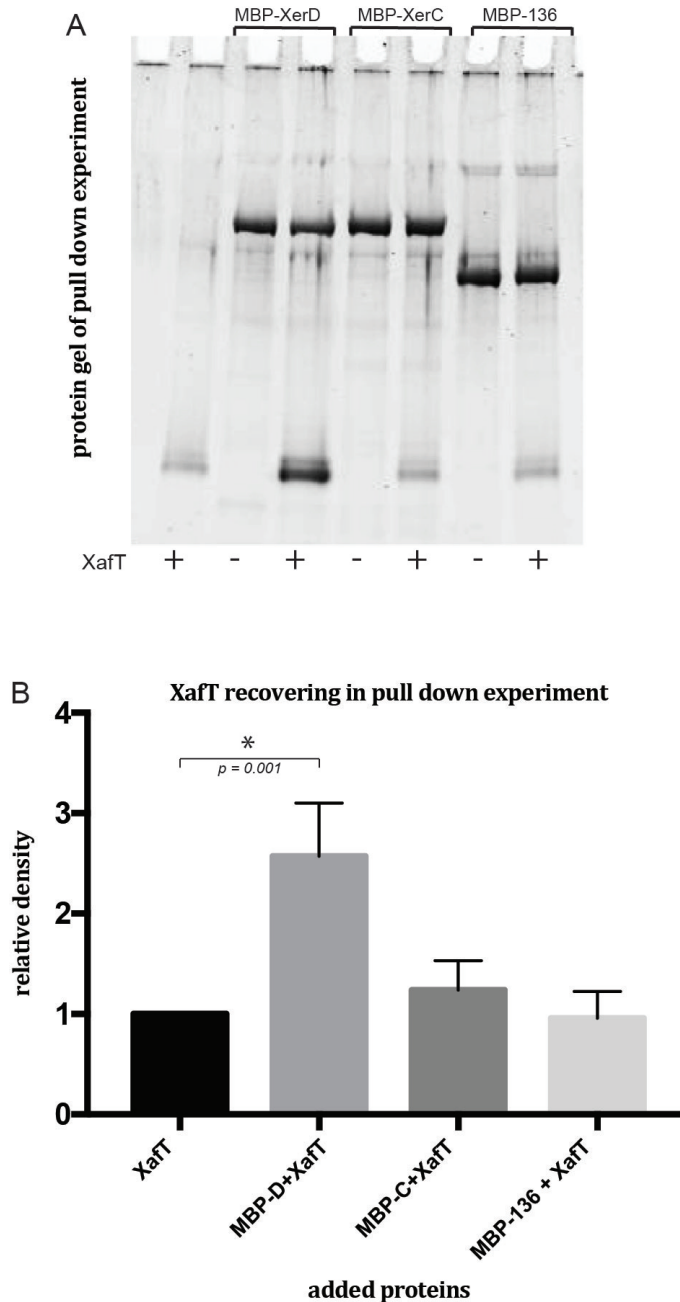


FIGURE 3.8 – XafT recovering in pull down assay of different MBP-tagged proteins. (A) gel of pull down. (+) and (-) signs indicate proteins added. (B) Graphic representation of XafT relative density in the different pull down conditions. $1\mu\text{M}$ of MBP-XerC, MBP-XerD or MBP-136 were incubated with or without $2\mu\text{M}$ of XafT. Analyses were made on three independent experiments. ANOVA test with Dunnett's correction was performed.

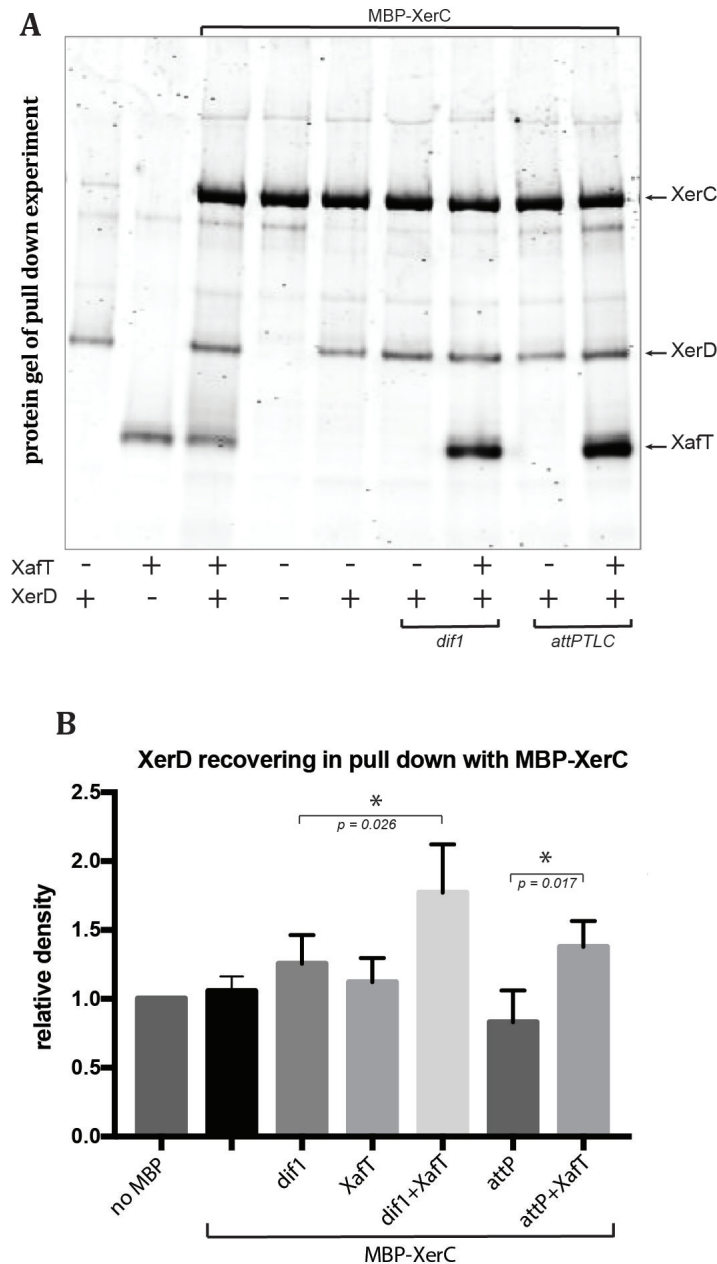


FIGURE 3.9 – XerD recovering in pull down assay of MBP-XerC, with XaT and *dif1*/or *attPTLC* sites. Same legend as Figure 3.8. Analyses were made on for independent experiments. ANOVA test with Tukey’s multiples comparisons was performed (see Figure 3.10).

Ordinary one-way ANOVA						
Multiple comparisons						
1	Number of families	1				
2	Number of comparisons per family	21				
3	Alpha	0.05				
4						
5	Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff.	95.00% CI of diff.	Significant?	Summary	Adjusted P Value
6						
7	D vs. C+D	-0.05817	-0.5303 to 0.414	No	ns	0.9996
8	D vs. C+D+XafT	-0.1227	-0.5949 to 0.3495	No	ns	0.9769
9	D vs. C+D+ dif1	-0.2551	-0.7273 to 0.217	No	ns	0.5888
10	D vs. C+D+dif1+XafT	-0.772	-1.244 to -0.2999	Yes	***	0.0005
11	D vs. C+D+attP	0.1692	-0.303 to 0.6413	No	ns	0.8996
12	D vs. C+D+attP+XafT	-0.3781	-0.8503 to 0.0941	No	ns	0.1750
13	C+D vs. C+D+XafT	-0.06451	-0.5367 to 0.4077	No	ns	0.9993
14	C+D vs. C+D+ dif1	-0.197	-0.6691 to 0.2752	No	ns	0.8180
15	C+D vs. C+D+dif1+XafT	-0.7139	-1.186 to -0.2417	Yes	**	0.0012
16	C+D vs. C+D+attP	0.2273	-0.2449 to 0.6995	No	ns	0.7044
17	C+D vs. C+D+attP+XafT	-0.3199	-0.7921 to 0.1523	No	ns	0.3353
18	C+D+XafT vs. C+D+ dif1	-0.1325	-0.6046 to 0.3397	No	ns	0.9665
19	C+D+XafT vs. C+D+dif1+XafT	-0.6494	-1.122 to -0.1772	Yes	**	0.0034
20	C+D+XafT vs. C+D+attP	0.2918	-0.1803 to 0.764	No	ns	0.4380
21	C+D+XafT vs. C+D+attP+XafT	-0.2554	-0.7276 to 0.2168	No	ns	0.5877
22	C+D+ dif1 vs. C+D+dif1+XafT	-0.5169	-0.9891 to -0.04474	Yes	*	0.0260
23	C+D+ dif1 vs. C+D+attP	0.4243	-0.04789 to 0.8965	No	ns	0.0970
24	C+D+ dif1 vs. C+D+attP+XafT	-0.1229	-0.5951 to 0.3492	No	ns	0.9767
25	C+D+dif1+XafT vs. C+D+attP	0.9412	0.469 to 1.413	Yes	****	<0.0001
26	C+D+dif1+XafT vs. C+D+attP+XafT	0.394	-0.07821 to 0.8661	No	ns	0.1438
27	C+D+attP vs. C+D+attP+XafT	-0.5472	-1.019 to -0.07505	Yes	*	0.0165

FIGURE 3.10 – **Table S4 : Statistical analysis of XerD recovering in pull down experiment with MBP-XerC.** Data were analysed using Prismgraphpad. ANOVA with Tukey test was performed. C= MBP-XerC, D= XerD. ns : $P > 0.05$, * : $P \leq 0.05$, ** : $P \leq 0.01$, *** : $P \leq 0.001$, **** : $P \leq 0.0001$. Statistical analysis was made on 4 independent replicates.

dif1 and XafT compare to conditions with only MBP-XerC , XerD and *dif1* site. This result suggests that XerC and XerD are able to bind more efficiently *dif1* site in presence of XafT.

When adding MBP-XerC and *attPTLC* no enrichment of XerD was obtained. Surprisingly XerD seems to stick slightly less to beads in presence of *attPTLC* DNA. Then significantly more XerD was recovered with MBP-

XerC, *attPTLC* DNA and XafT, indicating that XafT help XerD binding on *attPTLC* maybe by increasing binding cooperation between XerC and XerD.

Taken together these data suggest that XafT favors XerCD interaction or at least their binding on a *dif1* or *attPTLC* site. This could explain how a such degenerated sequence in *attPTLC* can form a synapse with *dif1* for Xer recombination.

Discussion

Here we characterized the phage factor used by TLC to integrate into *V.cholerae* chromosome I. The protein XafT encoded by the ORF VC1465 activates XerD by interacting directly and specifically with it. In addition to this XafT seems to increase the cooperative binding of XerC and XerD to the *attPTLC* site, which may explain how the degenerated *attPTLC* can form a synapse with *dif1* site.

XerD activation process

We demonstrated in this paper that direct interaction between XafT and XerD mediates activation of XerD to initiate the recombination process. As not only binding of XerD to its site but also the activation of the XerD strand exchange were mediated by XafT, we propose a model in which XafT interaction with XerD induces a conformational change of XerD responsible for these two activities. The synapse formed by this modified XerD would directly be in a conformation in favor for XerD cleavage. One mechanistic explanation based on current model could be that under XafT interaction the extreme Cter of XerD would interact with XerC in *cis* to be active [44, 40, 168, 36, 47].

We noticed in the process of recombination under XafT, an accumulation of HJ both in *in vitro* recombination assay and in *in vivo* intraplasmidic recombination assay (see Midonet et al. [30]). While in the case of a *dif/dif* recombination under FtsK, HJ are observable only in the presence of an intercalating agent [62]. Similar observation was reported in *in vitro* recombination assay using XerD fused with the FtsK gamma domain [171]. In the case of the FtsK activation, P. May et al. demonstrated using *in vitro* single molecules approaches that HJ were resolved after dissociation of FtsK of the synapse [29, 87]. It is possible that activators of XerD constrain a synapse conformation leading to an HJ unable to isomerize. Thus no XerC activation would be possible as long as the constrain persists. The only way to perform the second strand exchange would be the departure of the activator after HJ formation. In the case of FtsK, the departure could be achieved by FtsK hexamer dissociation or DNA translocation reversion. However *in vitro*, the accumulation of HJ in reaction using XafT or FtsK-gamma fused to XerD could be due to the fact that the departure of the activators could not be possible. We hypothesize that *in vivo* either a factor of the bacteria removes XafT from the synapse or replication fork converts HJ into product as suspected for IMEXS of CTX ϕ and VGJ ϕ types [138, 145].

XerD binding and DNA context for recombination

We determined that XafT activates XerD catalysis through direct interaction and increases cooperativity for XerCD binding to the *attPTLC* site. Blakely et al. demonstrated that binding of *E.coli*XerC is 40 to 160 better in presence of *E.coli*XerD on *dif* site [14, 38]. Efficiency of *E.coli*XerD binding was increased in presence of *E.coli*XerC too but no estimation was possible because XerC binding is poor on *dif* site. Thanks to this cooperativity they

have shown that *E.coli*XerC binding on a none-specific sequence is possible if *E.coli*XerD is bound on its specific DNA sequence[38]. XerD binding on a none-specific sequence was never observed before. Since cooperativity for binding exist between the XerC and XerD of *vibrio* we propose that XafT allows XerD binding on the degenerated sequence of *attPTLC* by this mechanism [30]. However 3 bp out of 11 bp are the one found in the consensus sequence of XerD recognition site. It is still unclear if these 3bp are necessary even in the presence of XafT to allow XerD binding, especially as the guanine in the major groove that is important for XerD interaction with DNA is conserved [38].

In vitro experiments indicated that no specific DNA sequences were required to activate recombination. However *in vivo* complementation assay have shown less integration with pBS89 that carry only *attPTLC* site (Figure 1B and C). We hypothesize that DNA context close to *attPTLC* on the XerD binding side can interfere with recombination. As the pSW23T backbone was cloned between XerC binding site and ORF VC1465 we tested an another construction with ORF VC1465 at the direct proximity of *attPTLC* on the XerC binding side as it must be the case in the circular dsDNA form of the phage. No differences in efficiency of integration *in vivo* were observed indicating that DNA environment on XerC side doesn't affect integration (data not shown). As the plasmid pCM31 carrying 186bp of the XerD binding adjacent region of *attPTLC* is able to integrate *in vivo* we asked if this region contains a recognition site for XafT. No specific binding of XafT was observed on this region when tested it by gel shift assay and using none-specific DNA as competitor (data not shown).

Stability of TLC could depend of XafT expression

We previously reported that the pathway of TLC excision is the same as TLC integration [30]. The process is initiated by XerD catalysis in an FtsK independent manner, and then XerC resolves the HJ formed. Nevertheless TLC integration was more efficient than excision in the tested conditions. Even under overexpression of XerCD recombinases that increases by 100 fold the frequency of integration, the efficiency of excision remained at a low frequency of 10^{-4} . As excision was the same under XerCD overexpression we hypothesized that after integration the quantity of XafT is limiting and therefore we tested the excision efficiency under XafT and/or XerCD overexpression. We observed a 5 fold increase of excision when overexpressing XafT and 10^3 fold increase when overexpressing XafT and XerCD. These results suggest that XafT expression is limiting the process of excision of TLC from the chromosome after integration. Few is known about the promotor of VC1465 and its regulation. The molecular signal inducing TLC excision have to be investigated as TLC departure removes CTX copies from Chr. I. VC1465 expression may be regulated by SOS response as Kamruzzaman, M et al. [160] were able to see loss of $TLC\phi$, $CTX\phi$ and $RS1\phi$ in almost half of the strains were SOS response was overexpressed. Fournes et al. [171] demonstrated that FtsK translocation inhibits *dif_{GGi}* excision that posses degenerated bases in the XerD binding site. It is possible that such mechanism favors the stability of prophage TLC however XafT seems to permit to go through the removing of XerCD recombinases maybe because recombination occurs when FtsK does not translocate DNA.

Interestingly, only one of the two or three successives integrated copies of $TLC\phi$ carries VC1465 while the other possess VC1471. We were not able to obtain integration of a TLC variant carrying VC1471 nor recombination between two *attPTLC* sites that could explain this chromosomal copies

and their positioning the most far away *dif1* that suggest they were the first IMEXs integrated (data not shown). Nevertheless we noticed that the first 63pb out of 168bp of VC1471 are the same that VC1465 beginning. As the quantity of XafT seems to limit excision it is possible that acquisition of multiple copies of TLC requires partial deletion of VC1465 through an unknown mechanism.

Material and method

In vivo integration : Plasmids to test for integration were transformed in donor β 2163 *E.coli* strains and conjugated to recipient CMV01 (modified strain of N16961) strain of *V.cholerae*. LB culture of donor (with DAP 0.3mM) and recipient cells were performed at 37°C until OD \approx 0.3-0.6 and mixed in proportions 1 donors for 10 recipients approximately. They were concentrated in 10 μ L and left on membrane on agar-LB-DAP plate during 3h at 37°C. After incubation membranes were removed and cells suspended in LB. Different dilutions were spreading on LB-agarose plates containing Kn (25 μ g/ml) and Xgal (40 μ g/ml) before overnight incubation at 37°C. A plasmid containing the full replicative TLC (pBS90) was used to estimate the efficiency of integration.

Protein purification : *E.coli* strains BL21 DE3 were used to overexpress proteins of interest. *E.coli* strains were transformed with plasmid for expression (see Table) and selected on Kn agar-LB plates. Cultures of 1L of LB+Kn were inoculated with colonies until exponential phase at 37°C under agitation then induced with 1mM of IPTG. Induction was performed at 20°C overnight under shaking. Induced cultures were pelleted, washed in LB and lysed with French press in presence of protease inhibitor (sigma

EDTA free), 1M NaCl (or 200mM for XerD), 1mM EDTA, 50mM Tris-HCl pH7). Lysates were centrifuged at 34 000g in PSF tubes then filtrated on 0,45 μ m and 0,2 μ m at 4°C. Purification was performed with AKTA purifier on MBPTrap column (GE Healthcare) and eluted in presence of 10mM of maltose. After quantification, fractions were digested overnight with TEV protease to obtain proteins without tag. To remove the tag and concentrate proteins, samples were purified on heparin column after cleavage and eluted using 1M NaCl. XerC, XerCKQ and XerD, XerDKQ were tested for binding in gel shift experiment before storage. Aliquots of proteins were conserved at -80°C.

In vitro recombination assay : Annealing of oligonucleotides to create *dif1*, or *attPTLC* sites were performed in 100mM NaCl with \approx 0.5 μ M of labelled oligos and \approx 0.6 μ M of none-labelled oligos. In some cases PCR products were used for none-labelled DNA. Reactions occurred 2h at 37°C with following final concentrations : 25mM Tris-HCl pH7.5, 1mM EDTA pH8, 10% glycerol, 100mM NaCl and 100ng/ml of BSA, 1pmol of labelled DNA, 2pmol of non-labelled DNA. After incubation samples were treated with proteinase K, 1h at 37°C. Then they were separated on acrylamide gel with 5% of acrylamide 29 :1 (Biorad), TBE 0.5X during 1h20 at 17mA. Gels were revealed with Typhoon (GE healthcare) using filters 670BP30 and 580BP30. In the case of assay with sequencing gel, urea-denaturing gel was used, containing 3% of acrylamide 19 :1 and 10% urea. Migration occurred 1h30 at 90W constant.

Pull down : Pull down experiments were performed in 1% Triton X-100, 100mM NaCl, 25mM Tris-HCl pH6.8, 1mM EDTA, 100ng/ml of BSA and 10% of glycerol. The final volume used was 50 μ L. Amylose coupled para-

magnetic beads were used to recover MBP-tagged proteins. Concentrations of proteins were the following : $1\mu\text{M}$ for MBP-tagged proteins and $2\mu\text{M}$ for none-tagged proteins. Samples were incubated 1h30 at RT then washed three times in 3X volumes. Elution occurred by warming up samples in $20\mu\text{L}$ final containing LDS buffer (added with β -mercaptoethanol). Samples were put under migration on acrylamide gel of gradient 4-20%. Staining of proteins was performed with fluorescent Krypton Stain (ThermoFisher Scientific).

Pull down quantification : Proteins bands were quantified using ImageJ software. Areas of pics were normalized with reference corresponding to proteins that stick to the beads (without tag). Relative density of bands were calculated by dividing the percentage of recovered protein with percentage of the pic of reference. Thus statistical relevance was tested using ANOVA (prism graphpad software).

Gels shift : Gels shift assay were performed in the same buffer than *in vitro* recombination. Proteins were incubated with DNA on ice 15min before loading on acrylamide gel 29 :1 of 5%. Gels were revealed as for *in vitro* recombination assay.

supplementary Material and Method

Table S1 : Plasmids

Name	Derive from	Properties	Source
pBS89	pSW23T	Ori R6K, Cm ^R , carrying <i>attPTLC</i> site	This study [30]
pBS126	pSW23T	Ori R6K, Cm ^R , carrying suicide form of TLC (stop mutation in <i>cri</i>)	
pCM1	pSW23T	Ori R6K, Cm ^R , partial suicide TLC obtained after XbaI, SpeI digestion of pBS126	This study
pCM7	pSW23T	Ori R6K, Cm ^R , partial suicide TLC obtained after NsiI digestion of pBS126	This study
pCM8	pSW23T	Ori R6K, Cm ^R , partial suicide TLC obtained after BglII digestion of pBS126	This study
pCM9	pSW23T	Ori R6K, Cm ^R , partial suicide TLC obtained after BspHI digestion of pBS126	This study
pCM10	pSW23T	Ori R6K, Cm ^R , partial suicide TLC obtained after AlwNI digestion of pBS126	This study
pCM31	pSW23T	Ori R6K, Cm ^R , partial suicide TLC obtained after SpeI, SmaI digestion of pBS126	This study
pCM32	pSW23T	Ori R6K, Cm ^R , partial suicide TLC obtained after AatII, SpeI digestion of pBS126	This study
pCM33	pSW23T	Ori R6K, Cm ^R , partial suicide TLC obtained after HpaI digestion of pBS126	This study
pCM23	pSW23T	Ori R6K, Cm ^R , carrying suicide TLC with stop mutation in VC1466	This study
pCM24	pSW23T	Ori R6K, Cm ^R , carrying suicide TLC with stop mutation in VC1465	This study
pCM34	pSC101	vector, Amp ^R , with VC1465 under <i>pAra</i> promotor	This study
pCM153	pBR322	vector, Kn ^R carrying MBP-6His-Tev(site)-VC1465 under T7 promotor and lacO operator	This study
pCM157	pBR322	vector, Kn ^R carrying MBP-6His-Tev(site)-vibXerC under T7 promotor and lacO operator	This study
pCM158	pBR322	vector, Kn ^R carrying MBP-6His-Tev(site)-ORF136 of VGJ ϕ under T7 promotor and lacO operator	This study
pCM162	pBR322	vector, Kn ^R carrying MBP-6His-Tev(site)-vibXerD under T7 promotor and lacO operator	This study
pCM163	pBR322	vector, Kn ^R carrying MBP-6His-Tev(site)-vibXerC(KQ) under T7 promotor and lacO operator	This study
pCM164	pBR322	vector, Kn ^R carrying MBP-6His-Tev(site)-vibXerD(KQ) under T7 promotor and lacO operator	This study

Table S2 : strain

Name	Genotype	Source
CMV01	N16961; $\Delta lacZ$; ChapR; <i>dif1</i> -prophages : : <i>e.coli lacZa-dif1-lacZb-FRT-sh ble-FRT</i> (zeo ^R)	[30]

Table S3 : primers

Name	Used for	Sequence
2481	PCR on pCM33 to generate linear fragment containing <i>attPTLC</i> with TLC DNA on XerD side and R6K backbone on XerC side	CCCGAGCTCCCTGCCAATCCTTACGATG
2206	PCR on pCM33 to generate linear fragment containing <i>attPTLC</i> with TLC DNA on XerD side and R6K backbone on XerC side	GCTTGATATCGAATTCCTGCAGCCC
3418	short labelled <i>dif1</i> for <i>in vitro</i> recombination	Cy5- cggATTTAACATAACATACATAATGCGCACTcgg-Cy3
3419	short labelled <i>dif1</i> for <i>in vitro</i> recombination	ccgAGTGCGCATTATGTATGTTATGTTAAATccg
3505	labelled short <i>attPTLC</i> for pull down and gel shift	Cy5- CGGCATTTCTCTACATACATAATGCGCACTCGG-Cy3
3506	labelled short <i>attPTLC</i> for pull down and gel shift	CCGAGTGCGCATTATGTATGTAGAGAAAAGTGCCG
3406	fwd <i>dif1</i> with 28bp on XerD side	agcAGTGCGCATTATGTATGTTATGTTAAATggcctaacgcctaagcggcgcctacg
3407	rev <i>dif1</i> with 28bp on XerD side	cgtaggcggcgccttaggcgcttaggccATTTAACATAACATACATAAATGCGCACTgct
3408	fwd <i>dif1</i> with 25bp on XerD side	agcAGTGCGCATTATGTATGTTATGTTAAATggcctaacgcctaagcggcgcct
3409	rev <i>dif1</i> with 25bp on XerD side	aggcggcgccttaggcgcttaggccATTTAACATAACATACATAAATGCGCACTgct
3410	fwd <i>dif1</i> with 20bp on XerD side	agcAGTGCGCATTATGTATGTTATGTTAAATggcctaacgcctaagcggc
3411	rev <i>dif1</i> with 20bp on XerD side	gccgcttaggcgcttaggccATTTAACATAACATACATAAATGCGCACTgct
3412	fwd <i>dif1</i> with 15bp on XerD side	agcAGTGCGCATTATGTATGTTATGTTAAATggcctaacgcctaagccta
3413	rev <i>dif1</i> with 15bp on XerD side	tttaggcgcttaggccATTTAACATAACATACATAAATGCGCACTgct
3414	fwd <i>dif1</i> with 10bp on XerD side	agcAGTGCGCATTATGTATGTTATGTTAAATggcctaacgc
3415	rev <i>dif1</i> with 10bp on XerD side	gcgcttaggccATTTAACATAACATACATAAATGCGCACTgct
3416	fwd <i>dif1</i> with 5bp on XerD side	agcAGTGCGCATTATGTATGTTATGTTAAATggcct
3417	rev <i>dif1</i> with 5bp on XerD side	aggccATTTAACATAACATACATAAATGCGCACTgct
2956	replace <i>attPTLC</i> with <i>dif1</i> in pCM33	TTATGTTAAATAAGACTACGAAACACAAACCAAG
2957	to replace <i>attPTLC</i> with <i>dif1</i> in pCM33	CATACATAATGCGCACTAGGATC

3.3 Résumé

Par une approche génétique de délétions partielles du génome de TLC et des tests d'intégrations *in vivo* nous avons démontré au sein de cet article que le génome de TLC code pour une protéine accessoire nécessaire à la réaction de recombinaison entre *attPTLC* et *dif1*. Le gène VC1465 code pour ce facteur XafT (Xer activation factor of TLC), une protéine de 194 aa prédite comme putative protéine de liaison à l'ADN et régulateur transcriptionnel car elle possède un domaine hélice-tour-hélice de type XRE (xenobiotique response element). En Cter, elle possède un autre domaine de fonction inconnue DUF3653 caractéristique de protéines de phages. Une rapide recherche des domaines DUF3653 dans les bases de données Pfam et Uniprot nous indique que ces domaines semblent plus particulièrement présents dans des protéines codées par des IMEXs de types TLC et retrou-

vés intégrés dans le génome de bactéries telles que les *Xanthomonadales*, les *Vibrionales* et certaines β -protéobactéries telles que *Nitrosomonas europaea* ou *Thiobacillus denitrificans*. Ces protéines ne possédant pas toutes un domaine HTH prédit en Nter, il est probable que leur fonction d'activation de la recombinaison soit portée par le DUF3653.

Par la suite j'ai purifié les recombinases XerC et XerD ainsi que XafT et reconstitué la réaction de recombinaison *in vitro* en utilisant des ADN linéaires couplés à des fluorophores Cy3 et Cy5. Ces derniers m'ont notamment permis de suivre les échanges de brins réalisés par XerC ou XerD. J'ai ainsi démontré que la protéine XafT est nécessaire et suffisante pour activer la recombinaison Xer entre un site *attPTLC* et *dif1*. En utilisant des mutants catalytiques de XerC et XerD (mutants KQ), j'ai vérifié que la réaction recombinaison obtenue *in vitro* est initiée par XerD comme cela avait été observé *in vivo* [30]. *TLC ϕ* est donc capable de s'intégrer via une voie XerD indépendamment de FtsK car il possède un facteur capable d'activer XerD.

Via cet essai de recombinaison *in vitro*, j'ai également démontré que XafT active XerD également sur des synapses *dif1/dif1* et que les bases dégénérées du site *attPTLC* ne sont pas requises pour son activité. Aucune séquence accessoire sur le génome de *TLC* ne semble nécessaire pour cette activation. Enfin nous avons démontré que XafT interagit directement avec XerD pour permettre cette activation. Elle semble augmenter la coopération de liaison sur un site ADN entre XerD et XerC, ce qui permettrait à *TLC* de fixer XerD sur une séquence dégénérée par rapport à la séquence consensus du site de fixation de XerD.

3.4 Discussion détaillée

3.4.1 Mécanisme d'activation de XerD et modification de la coopération de liaison entre XerC et XerD

Nous avons démontré *in vitro* dans cet article que XafT interagit directement avec XerD pour activer la recombinaison. Cette interaction semble augmenter la coopération de liaison entre XerC et XerD pour un site. L'augmentation de la coopération de liaison n'est pas nécessaire pour un site *dif1* qui est déjà un bon site de liaison pour XerD, mais elle permet très probablement la fixation de XerD sur le site *attPTLC* malgré les bases dégénérées par rapport à la séquence consensus.

In vitro et sur les recombinases de *E. coli*, Blakely et al. avaient déjà observé qu'il est possible de lier XerC sur un site *dif* dépourvu de séquence spécifique de liaison de XerC, via la coopération de liaison si XerD se fixe sur son site cible [38]. Puisque la coopération de liaison entre XerC et XerD existe aussi avec les recombinases de *V. cholerae* [30], nous proposons ici que XafT facilite la fixation de XerD sur *attPTLC* en jouant sur ce mécanisme. Cependant le site *attPTLC* possède tout de même 3pb sur les 11pb du site de fixation de XerD, qui sont conservées par rapport à la séquence consensus. Nous ignorons si ces 3pb sont absolument requises pour permettre l'activation par XafT et la fixation de XerD, tout particulièrement car la Thymine au pied de la région centrale et la Guanine présente dans le grand sillon de l'ADN (et importante pour l'interaction de XerD avec l'ADN) sont conservées.

Nous noterons également que la liaison de XerCD au site *attPTLC* *in vitro* a toujours été testée en utilisant uniquement des sites *attPTLC* sans site *dif1*. Or nous nous intéressons ici à des synapses entre *attPTLC* et *dif1*.

Il est donc possible que XerD se fixe mieux sur le site dégénéré présent sur *attPTLC* lorsqu'un début de synapse impliquant deux XerC et un XerD s'est formé entre *attPTLC* et *dif1*. Une pré-synapse à trois recombinaases seraient alors un meilleur substrat pour la fixation du second XerD qu'un site dimérique.

D'après les modèles actuels, la paire de recombinaases actives dans la synapse est celle donnant son bras extrême Cter en *cis*. Nous proposons donc le modèle suivant : XafT induit un changement conformationnel de XerD en interagissant avec lui. Cette conformation serait favorable pour que XerD donne son bras Cter en *cis* à XerC en plus d'améliorer la coopération de liaison. Par la suite, une fois la synapse formée, soit XerD est directement actif dans cette conformation, soit XafT l'active dans un second temps.

Nous avons remarqué *in vivo* [30] comme *in vitro*, une accumulation de HJ lors d'une recombinaison *attPTLC/dif1* médiée par XafT. Ceci fut surprenant puisque XerC est très efficace pour résoudre les HJ. Néanmoins le même genre de phénomène a déjà été observé lors d'essais de recombinaisons *in vitro* avec des fusions γ XerD [171]. De plus les travaux de P. May et al. [87, 29] utilisant trois techniques de biophysique en molécule unique ont mis en évidence que l'isomérisation de la HJ et le clivage de XerC ne se font qu'après départ de FtsK : soit par dissociation ; soit par réversion de la translocation. Il est donc fortement probable qu'*in vitro*, le gamma de γ XerD ou XafT restent au niveau de la synapse, forçant une conformation favorable à l'échange pour XerD mais empêchant ou limitant l'isomérisation nécessaire à la catalyse par XerC. *In vivo* il est donc possible que la HJ soit résolue aussi bien par un second échange de brins par XerC que par le passage de la fourche de réplication en présence de XafT.

3.4.2 Résultats préliminaires sur la coopération de liaison entre XerC et XerD sur un site *dif1* ou *attPTLC*

Pour des raisons de simplification d'écriture nous n'avons pas soulevé la nuance possible entre la coopération de liaison ou le simple fait d'améliorer la fixation de XerD sur un site *dif* ou *attPTLC*. Même si cela semble moins possible, les données de pull down avec MBP-XerC présentées ne permettent pas d'exclure que XafT augmente la capacité de fixation de XerD. Notons néanmoins qu'*attPTLC* différant grandement de *dif1* dans le bras de fixation de XerD, si XafT changeait l'affinité de XerD il serait étonnant que ce soit aussi bien à la faveur de *dif1* que *attPTLC* (une augmentation de la quantité de XerD récupérée étant observée pour les deux sites figure 3.9).

Nous avons donc récemment cherché à optimiser les conditions de gels shift et nous sommes inspirés du système utilisé par H.-E.Sayyed et al. [172] pour démontrer l'interaction de TopoIV avec XerC sur un site *dif*. Le principe est le suivant : deux sites ADN courts et de même taille sont marqués avec deux fluorophores différents. Dans notre cas, le site *dif1* est (34pb) couplé à Cy5 alors qu'un ADN non spécifique de même taille est couplé à Cy3. Les gels shift sont alors réalisés dans des conditions équimolaires de chaque substrat. Nous suivons quel ADN est préférentiellement retardé en présence de XafT (voir résultat Figure 3.11).

En présence de concentration croissante de XafT et des deux sites ADN marqués nous observons que XafT finit effectivement par emmener l'ADN dans les puits. Nous remarquons également qu'alors que les deux ADN ont été mis dans des conditions équimolaires, la quasi totalité de *dif1* est emmenée dans les puits avant l'ADN aspécifique. Pour des raisons de lisibilité

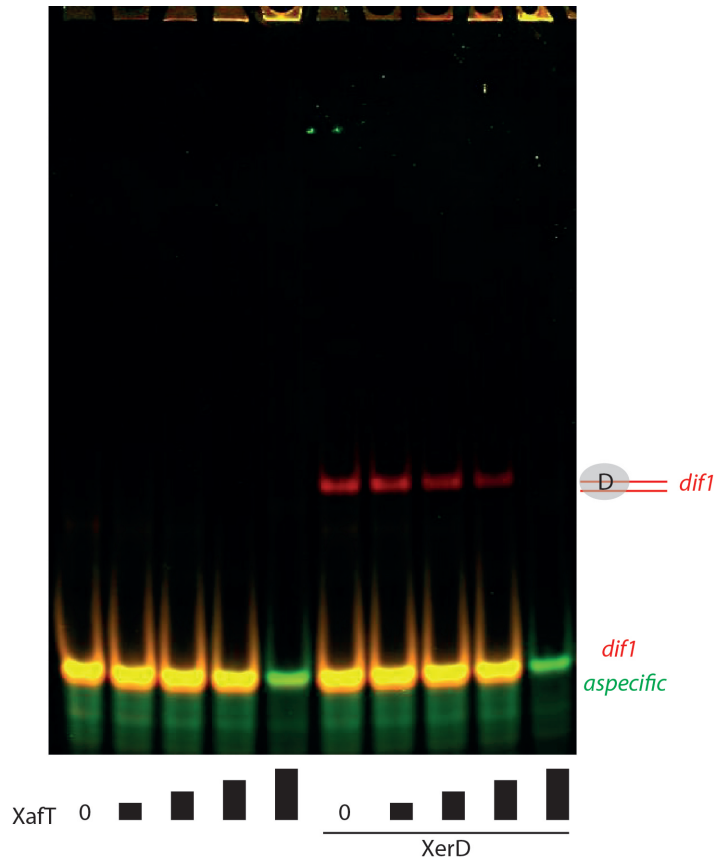


FIGURE 3.11 – Gel shift d'un site *dif1* versus ADN non spécifique en présence de XafT et / ou XerD. L'ADN non spécifique de 34 pb est en vert (fluorophore Cy3). Le site *dif1* de 34bp est en rouge (fluorophore Cy5). Des concentrations croissantes de XafT ont été utilisées et sont représentées par des barres noires (testé : 30nM, 92nM, 280nM et 830nM). Une concentration constante de XerD (60nM) a été utilisée. Le "merge" des deux images a été réalisé avec le logiciel ImageJ.

de la figure nous avons forcé l'exposition des couleurs pour pouvoir les voir en fond noir. Nous perdons par conséquent en finesse d'analyse. Mais une quantification des bandes sous ImageJ à partir des fichiers sources nous permet de voir un shift de *dif1* dès 280nM de XafT alors que l'ADN non spécifique n'est pas retardé. Ces résultats suggèrent que XafT est bien une protéine de liaison à l'ADN et qu'elle est plus affine pour un site *dif1* que pour un site aspécifique. En présence de XerD on observe un simple shift

spécifique de *dif1* et correspondant à la fixation de XerD sur le site. Suite à l'ajout de quantités croissantes de XafT, la bande correspondant au complexe XerD/*dif1* disparaît progressivement indiquant que le complexe est shifté par XafT. Ceci était attendu puisque XafT interagit avec XerD. Une quantification du substrat *dif1* seul en parallèle indique que le complexe *dif1*/XerD est préférentiellement shifté par rapport à *dif1* seul mais que celui-ci est tout de même toujours lié par XafT. Ce premier gel nous suggère donc un ordre de préférence pour XafT qui est le suivant : *dif1*/XerD > *dif1* > aspécifique.

J'ai ensuite réalisé le même type d'expérience avec les deux recombinaïses (voir Figure 3.12). Nous observons là encore le même phénomène que ci-dessus en présence de *dif1*, XerD et XafT. Lors de l'ajout de XerC, le double shift de *dif1* correspondant à la liaison des deux recombinaïses apparaît. Étonnement en présence de concentration croissante de XafT, le double shift n'est quasiment pas affecté, alors que XerD/*dif1* et *dif1* seul sont emmenés dans les puits.

Ces résultats suggèrent qu'une fois les deux recombinaïses fixées sur un site *dif1*, XafT n'est plus en mesure d'interagir avec cet ADN, et de l'emmener dans les puits. Théoriquement, XerD est toujours accessible pour XafT mais ce dernier ne précipite pas le complexe dans les puits, laissant supposer que c'est l'interaction de XafT avec l'ADN qui est responsable de ce phénomène. En présence de XerD seul sur un site *dif1* par contre, l'ADN n'est pas "protégé" de XafT. Ce second gel nous suggère donc que XafT interagit préférentiellement comme suivant : *dif1*/XerD > *dif1* > XerC+XerD/*dif1* ≈ aspécifique.

Afin de mieux comprendre l'interaction de XafT avec le site *dif1*, j'ai réalisé des tests préliminaires en comparant ses affinités pour un site *dif1* versus *attPTLC*, ou entre un site *attPTLC* et un ADN non spécifique

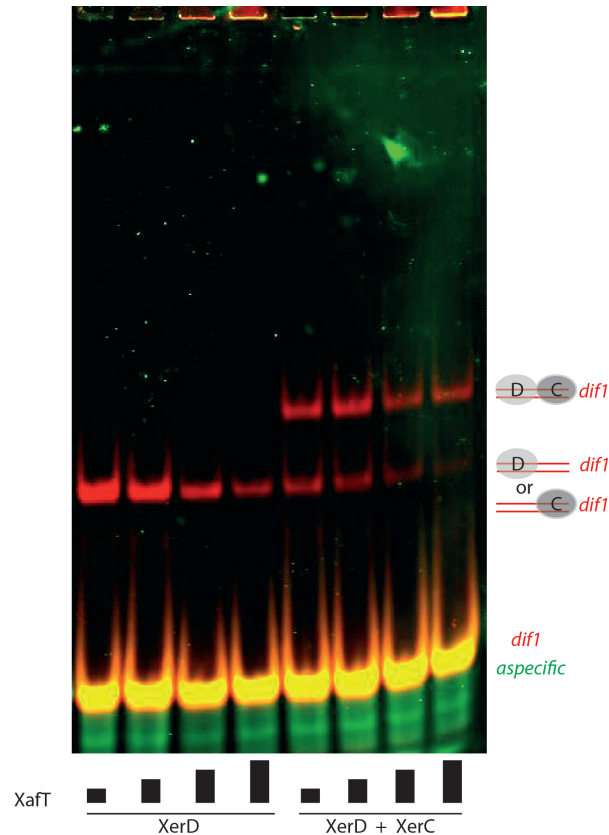


FIGURE 3.12 – Gel shift d’un site *dif1* versus ADN non spécifique en présence de XafT, XerD et / ou XerC. Même légende que Figure 3.11. XerC a été utilisé à 370nM (concentration à laquelle je n’ai pas vu de simple shift de *dif1* par XerC).

(données non montrées). J’ai alors remarqué que XafT lie de manière indifférenciée *dif1* ou *attPTLC* alors qu’elle est plus affine pour *attPTLC* par rapport à un ADN non spécifique. Enfin des résultats préliminaires suggèrent que XafT ne shift pas un site *dif1* lié par XerC (données non montrées). Bien que ces résultats soient préliminaires, j’ai choisi de ne pas les montrer ici car ils nécessitent d’être reproduits et investis d’avantage, ils nous obligent à repenser le modèle selon lequel XafT aide à la coopération de liaison entre XerC et XerD sur un site *dif1* ou *attPTLC*.

Modèle 1 : XafT induit un changement conformationnel de XerD lui permettant de se lier sur un site non spécifique grâce à la fixation de XerC sur sa séquence cible. Dans ce modèle XerC permettrait donc le recrutement d'un complexe XerD+XafT (voir Figure 3.13).

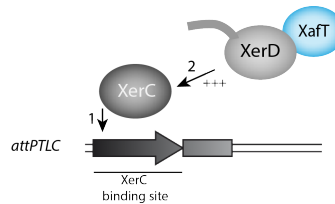


FIGURE 3.13 – Modèle 1 : XafT induit un changement conformationnel de XerD modifiant son affinité pour un site ADN. 1 : fixation de XerC. 2 : recrutement de XerD dont la structure serait modifiée par XafT. La coopération de liaison entre XerC et XerD est augmentée et XerD arrive dans une conformation favorable pour qu'il donne son bras Cter en *cis*.

Modèle 2 : XafT reconnaît le site de fixation de XerC et charge XerD. Dans ce modèle la fixation d'un dimère XerCD sur un site *attPTLC* se ferait en deux temps. Dans un premier temps, un complexe XafT+XerD reconnaîtrait le site de fixation de XerC (voir Figure 3.14). Puis dans un second temps, XerD recrute XerC via la coopération de liaison ce qui entraîne le départ de XerC (voir Figure 3.14).

3.4.3 La stabilité de TLC semble dépendre de XafT

Lors de l'étude de l'intégration de TLC nous avons démontré que la voie d'excision était la même, à savoir : XerD initie le premier échange de brins donnant lieu à une HJ résolue par XerC [30]. Cette réaction est également indépendante de l'activation par FtsK (données non montrées). Nous avons noté que la surexpression des XerCet XerD (sous pAra) augmentait

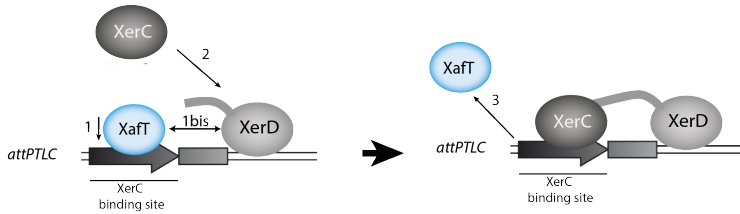


FIGURE 3.14 – **Modèle 2 : XafT reconnaît le site de fixation de XerC et charge XerD.** 1 : liaison de XafT sur la séquence de fixation de XerC. 1bis : interaction de XafT avec XerD et recrutement de XerD sur la séquence dégénérée. XerD est dans une conformation favorable pour donner son bras Cter en *cis*. Il est possible que ce soit un complexe XafT+XerD qui regroupe les étapes 1 et 1bis. 2 : La fixation de XerD sur un site ADN augmente la coopération de liaison entre XerC et XerD et recrute XerC. 3 : XerC étant plus affiné pour son site après interaction avec XerD chasse XafT et se lie sur sa séquence cible.

la fréquence d'intégration de TLC de 100 fois passant de 10^{-3} à 10^{-1} sur 3h. Cependant la fréquence d'excision de TLC n'était pas améliorée par la surexpression des XerCD et restait à 10^{-4} sur 3h. Etant donné que la fréquence d'excision était la même également en cas de surexpression des XerCD nous avons supposé qu'après intégration la quantité de XafT est limitante : soit suite à une inhibition de l'expression ; soit parce qu'il n'y a plus qu'une seule copie intégrée au chromosome. Pour tester cette hypothèse nous avons construit un pTLC avec VC1465 sous promoteur pAra. Nous avons alors testé l'excision de TLC dans une souche surexprimant ou non XerC, XerD et surexprimant ou non XafT (voir Figure 3.15)

Comme vu précédemment dans Midonet et al. [30], la surexpression de XerC et XerD ne modifie pas la fréquence d'excision. Une légère augmentation (approx. 5 fois) de l'excision semble résulter de la seule surexpression de XafT. Par contre la surexpression simultanée de XerC, XerD et XafT augmente de 1000 fois la fréquence d'excision. Ces données suggèrent que la quantité de XafT et de XerCD est limitante pour l'excision de TLC. Nous

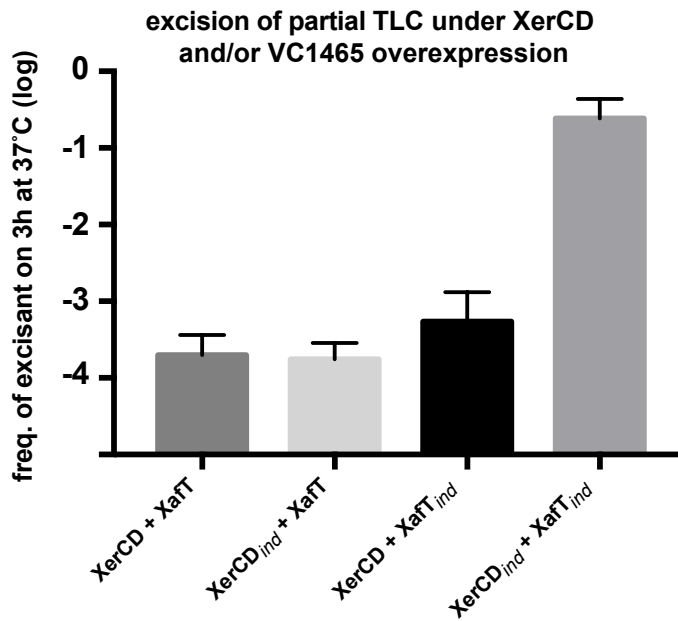


FIGURE 3.15 – Représentation graphique de la fréquence d’excision d’un pTLC à partir du chromosome. ind= inductible car sous promoteur pAra. L’induction a été réalisée avec 0.2% d’Arabinose

ignorons actuellement où est le promoteur de VC1465 et quel est sa régulation. Comprendre cette régulation et les signaux induisant la transcription de VC1465 est important puisque l'excision de TLC co-excise CTX et joue un rôle indirect dans l'évolution de la toxine cholérique chez *V.cholerae*. Il est possible que la réponse SOS augmente l'expression de XafT puisque Kamruzzaman, M et al.[160] ont pu détecter des excisions de TLC ϕ , CTX ϕ et RS1 ϕ dans la moitié de leurs essais lors de la surinduction de la réponse SOS chez *V. cholerae* (voir Figure 2.6).

Fournes et al. [171] ont également démontré que la translocation de FtsK au chromosome inhibe la recombinaison d'excision entre un site dif_{GGi} et dif de *Neisseria* (dif_{Ng}). Ce mécanisme serait dû aux bases dégénérées présentes sur le site de fixation de XerD dans dif_{GGi} . En effet la translocation de FtsK ne s'arrêterait pas sur ce site même s'il est chargé des recombinases. Il est donc probable que FtsK inhibe *in vivo* l'excision de TLC et stabilise le prophage. Cependant il semblerait que XafT permette tout de même l'excision de TLC lorsqu'il la protéine est surproduite avec les XerCD. Il est probable que ce soit parce XafT renforce la fixation de XerD sur le site (justement ou jouant sur la coopération XerC-XerD). Mais il est également possible que ce soit parce que la recombinaison a lieu lorsque FtsK ne transloque pas l'ADN.

Enfin nous avons remarqué que les souches positives pour TLC (O1 El Tor ou Classique) possèdent deux à trois copies du prophage, intégrées en tandem [156, 155]. Invariablement, une des copies possède VC1465 alors que les autres ont une ORF VC1471. De manière surprenante les copies possédant VC1471 sont les plus éloignées de dif . Ceci suggère que ce sont les premières à s'être intégrées. Nous avons donc testé *in vivo* l'intégra-

tion d'une version de TLC possédant VC1471 mais n'avons détecté aucune intégration (données non montrées). Nous avons également testé *in vivo* l'intégration d'un TLC dans un site *attPTLC*, ce qui pourrait expliquer la position des ces versions de TLC puisque XafT peut agir en *trans*. Là encore nous n'avons pu détecter aucune intégration (données non montrées). Néanmoins nous avons noté que les premières 63pb (sur 168pb) de VC1471 sont les mêmes que celles de VC1465. Étant donné que la quantité de XafT semble limitante pour l'excision de TLC il est possible que la stabilité de multiples copies de TLC requiert une délétion partielle dans VC1465 via un mécanisme inconnu.

3.4.4 Contexte ADN lors de la recombinaison

Les expériences *in vitro* suggèrent que l'activation par XafT ou la fixation de XerD ne requiert pas de séquence spécifique ADN présente sur la génome de TLC. Cependant lors des essais *in vivo* de complémentation en *trans* avec VC1465 nous avons noté que le plasmide pBS89 contenant uniquement *attPTLC* ne recouvre pas un taux d'intégration identique à celui du phage entier (Figure 1B et C de l'article). Il était alors possible que la région adjacente au site *attPTLC* côté XerD soit une région accessoire importante pour la recombinaison *in vivo*. Pour tester cette hypothèse, j'ai réalisé des gel shift de cette séquence ADN avec XafT, mais aucune interaction spécifique de XafT avec cet ADN n'a pu être observée (donnée non montrée). J'ai ensuite réduit progressivement par délétion cette région ADN sur un pTLC, et testé l'efficacité d'intégration avec un test d'intégration suicide sur 3h, et une complémentation en *trans* de VC1465 (voir Figure 3.16).

J'ai alors remarqué une grande variabilité d'efficacité d'intégration entre

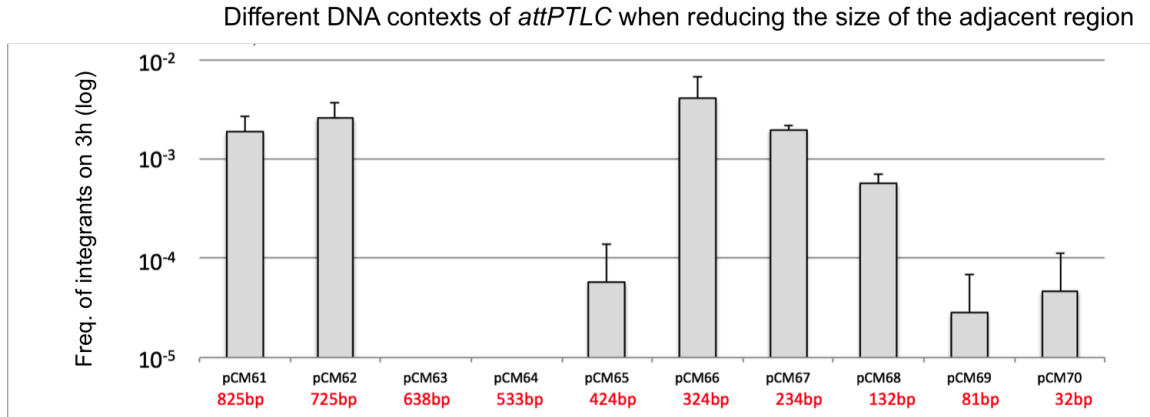


FIGURE 3.16 – Le contexte ADN du site *attPTLC* côté XerD affecte l'efficacité de recombinaison. En rouge est indiquée la taille de la région adjacente conservée au pied de *attPTLC*.

les différentes constructions. Nous n'avons ni observé de taille critique en dessous de laquelle il n'y a pas de recombinaison, ni vu de diminution graduelle en fonction de la taille de cette région. Cependant, aux vues de sa position en amont du gène *cri* (codant pour la nickase permettant l'initiation de la réplication), cette région contient sûrement l'origine de réplication de TLC pour la réplication en cercle roulant. On note effectivement dans cette région des séquences riches en A et T, caractéristiques de la formation de structures secondaires de l'ADN de type tige-boucle.

Nous avons donc fait l'hypothèse que le contexte ADN environnant le site *attPTLC* peut interférer avec la recombinaison en raison de la formation de structures secondaires de l'ADN. Étant donné que nous avons cloné le génome de TLC dans un vecteur R6K, à l'intersection entre *attPTLC* du côté du site de fixation de XerC et la fin de l'ORF VC1465 nous avons déplacé le vecteur de manière à avoir VC1465 à proximité directe de *attPTLC* comme cela doit être le cas dans la forme circulaire double brins de TLC. Aucun changement dans la fréquence d'intégration n'a été observé avec

cette construction comparé à celles utilisées préalablement. Ceci suggère que l'environnement ADN du site *attPTLC* côté XerC semble ne pas affecter la recombinaison.

Chapitre 4

Résultats partie III : Interdépendance entre RecA et l'activité de XerCD

4.1 Contexte

Étant donné que XafT semble activer la recombinaise XerD_{*V.ch.*}, nous avons testé si cette dernière pouvait également activer XerD_{*E.coli.*}. Pour cela j'ai construit une souche exprimant les recombinaises XerCD_{*V.ch.*} ou XerCD_{*E.coli.*} au locus *xerc* et sous contrôle du promoteur pAra.

Pour les souches contenant XerCD_{*E.coli.*}, j'ai remplacé le site *dif1* par *dif_{E.coli.}* puisqu'il s'agit de leur site cible. Comme le site *dif_{E.coli.}* diverge du site *dif1* par trois paires de bases, j'ai créé un site *attPTLC_{E.coli.}* tenant compte de ces différences. Les tests d'intégrations dans ces souches de *V. cholerae* ont démontré que TLC ne semble pas capable de s'intégrer en utilisant les recombinaises d'*E.coli* (voir Figure 4.1).

Ces données suggèrent que XafT active spécifiquement la recombinaise XerD de *V. cholerae*. Ces résultats ont été confirmés par les essais de re-

<i>attP</i>	<i>dif</i>	Xer	integration
TLC	<i>V.ch</i>	<i>V.ch</i>	+++
		<i>E.coli</i>	-
TLC ^{EC}	<i>E.coli</i>	<i>V.ch</i>	+++
		<i>E.coli</i>	-

FIGURE 4.1 – Table récapitulative de l’essai d’intégration de TLC en présence des XerCD d’ *E.coli*. Le site *dif* de *V.cholerae* utilisé est *dif1*. +++ : fréquence d’intégrants sur 3h entre 10^{-3} et 10^{-4} . - : aucun évènement d’intégration détecté.

combinaison *in vitro* pour lesquels l’utilisation des XerCD_{*E.coli*} n’a donné aucun produit ni HJ, même en présence de XafT (données non montrées). Cependant les expériences de pull down avec MBP-XerD_{*E.coli*} ou MBP-XerC_{*E.coli*} ont montré un enrichissement de XafT en présence de XerD_{*E.coli*} tout comme avec les recombinases de *V. cholerae* (voir Figure 4.2). Ce n’est donc pas l’absence d’interaction avec XerD_{*E.coli*} qui explique le défaut d’activation par XafT.

Les recombinases XerC et XerD étant très conservées chez les bactéries [11, 9] ces observations ont suscité notre intérêt concernant les disparités entre XerCD_{*E.coli*} et XerCD_{*V.ch.*}.

Nous souhaitions déterminer si les différences d’activation des Xer entre ces deux espèces pouvaient expliquer les différents comportements observés préalablement dans la recombinaison Xer. Premièrement les recombinases XerCD_{*V.ch.*} sont capables de faire de la recombinaison XerD indépendamment de l’activation par FtsK, même si cela est en faible quantité [31].

XafT recovering in pull down experiment with MBP-Xer

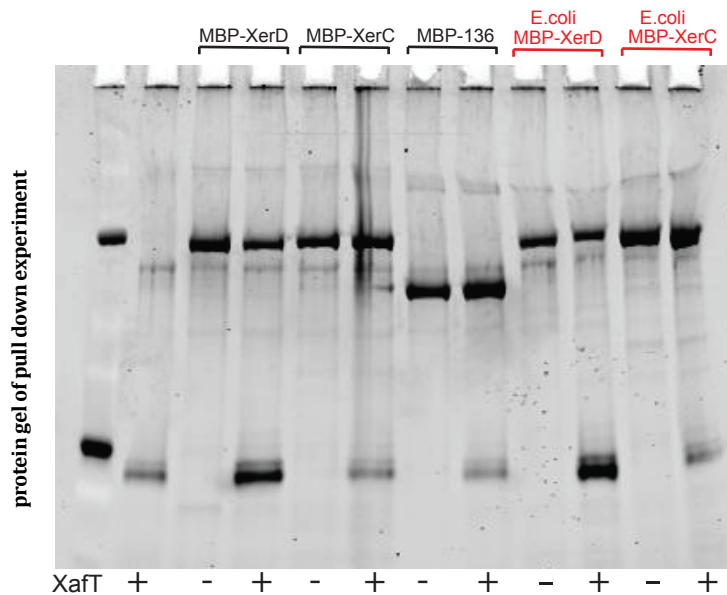


FIGURE 4.2 – Gel de protéine montrant l’enrichissement de XafT en présence de MBP-XerD de *V.cholerae* ou *E.coli*. Les signes + et - indiquent l’ajout ou non de XafT. MBP-136 correspond à une protéine contrôle (de VGJ ϕ) possédant le même tag que les Xer.

Cette auto-activation n’a pas été observée avec XerD_{*E.coli*}. Deuxièmement nous nous sommes particulièrement intéressés au fait que la recombinaison Xer est dépendante de la protéine RecA chez *E. coli* mais pas chez *V. cholerae* [173, 61, 59]. Comme nous l’avons évoqué dans l’introduction la formation des dimères de chromosomes résulte d’un nombre impair de crossing-over entre les deux chromosomes fils issus de la réplication. Ces crossing-over sont le résultat de la recombinaison homologue, mécanisme cellulaire nécessitant l’intervention de la protéine RecA (pour revue voir *S. C. Kowalczykowski 2015* [174]). En absence de RecA il n’y a donc pas de formation de dimère de chromosomes.

Chez *E.coli*, le fait que la recombinaison de cassettes ADN contenant deux sites *dif* au chromosome soit dépendante de RecA suggère que c’est

parce qu'en absence de formation de dimère de chromosomes, FtsK n'active pas la recombinaison. Par contre chez *V.cholerae* l'excision de cassette ADN n'est pas affectée dans un mutant $\Delta recA$ ce qui suggère que les XerCD peuvent être activées même en l'absence de formation de dimère.

Nous avons donc cherché à savoir si ces différences résultaient des propriétés intrinsèques des recombinases. Nous avons émis l'hypothèse que les XerCD_{*E.coli*} seraient plus difficiles à activer que celles de *V. cholerae*.

Pour tester cette première hypothèse nous avons interverti les recombinases Xer entre *V. cholerae* et *E.coli* et testé l'effet d'un mutant $\Delta recA$ sur l'excision de cassette ADN. Cette étude s'inscrit dans un article en cours d'écriture et réalisé avec la collaboration d'un autre membre de l'équipe : Elisa Galli ; qui a notamment réalisé toute la partie microscopie. Je ne vais présenter ici qu'une partie des données de ce travail.

4.2 La dépendance à RecA pour la recombinaison *dif/dif* ne s'explique pas par les différentes propriétés des Xer de *E. coli* et *V. cholerae*

4.2.1 Le test d'excision de cassette et vérification de la RecA-dépendance de la recombinaison Xer

Afin de tester l'activation de la recombinaison XerCD entre deux sites *dif* situés au chromosome nous avons utilisé le test d'excision de cassettes préalablement publié [59]. Le site *dif* bactérien a été remplacé par une cassette ADN (1kb) contenant deux sites *dif* en orientation directe. L'un des deux sites se trouve à l'extérieur du gène *lacZ* d'*E.coli* et le second est cloné

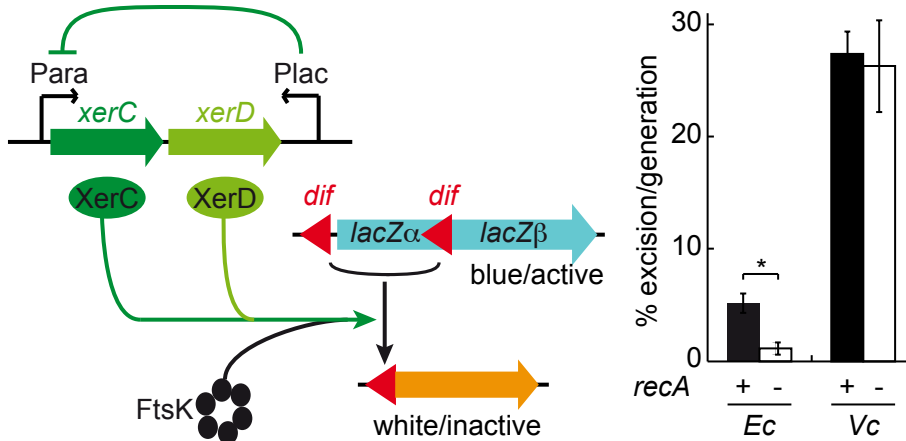


FIGURE 4.3 – Dépendance à RecA lors d’essais d’excision de cassette en LB. **Gauche** : Schéma représentant le test d’excision de cassette contenant deux sites *dif*. Les gènes codant pour XerC et XerD en vert foncé et clair respectivement, sont sous contrôle du promoteur P_{ara} . Un promoteur P_{lac} situé à la fin du gène *xerD* et en orientation inverse sert à limiter la fuite du promoteur P_{ara} en présence d’IPTG. L’hexamère de Ftsk est représenté par des cercles noirs. Après recombinaison entre les deux sites *dif* en intramoléculaire *lacZ* est partiellement délété. **Droite** : Graphique représentant le pourcentage d’excision de cassette par générations chez *E.coli* (Ec), ou *V.cholerae* (Vc). + et - indiquent si la souche est délétée pour le gène *recA* ou non. * : significativement différent (t test avec $p < 0.0001$).

en phase dans *lacZ* de manière à obtenir une β -galactosidase fonctionnelle (voir Figure 4.3 gauche). En absence de recombinaison et sur boites LB+Xgal, les bactéries dégradent le Xgal et les colonies apparaissent alors bleues. En cas de recombinaison entre les deux sites *dif*, le gène *lacZ* est partiellement délété, la β -galactosidase n’est plus produite et les colonies sont blanches même en présence de Xgal.

En accord avec ce qui a été publié précédemment [173, 61, 59], le pourcentage d’excision de cassettes chez un mutant $\Delta recA$ est inférieur à celui de la souche *wt* chez *E.coli* (voir Figure 4.3 droite). La recombinaison n’est pas affectée chez *V. cholerae*.

Nous avons alors comparé les différents niveaux de dépendance à RecA

entre les différentes souches créées et contenant des versions de XerCD de *V. cholerae* ou *E. coli* (voir Figure 4.4).

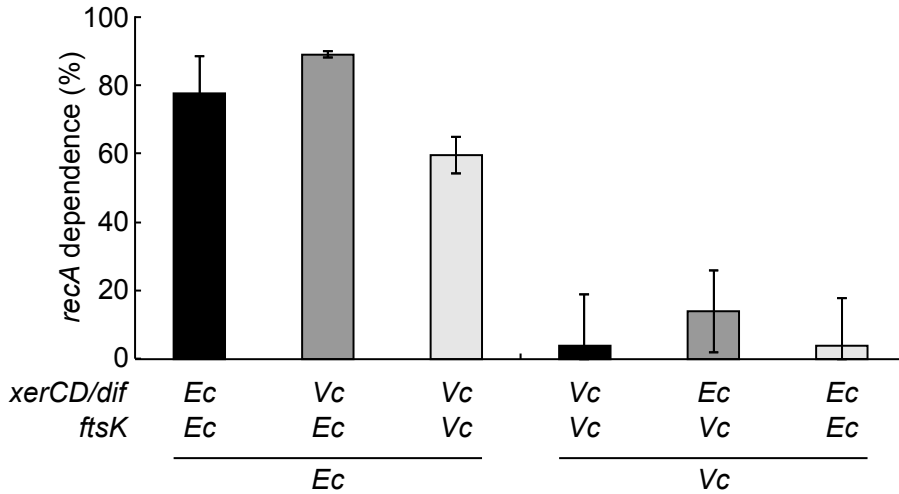


FIGURE 4.4 – Graphique représentant la dépendance de la recombinaison Xer à RecA en fonction des Xer utilisées. Ec : *E. coli*, Vc : *V. cholerae*, ftsK : correspond plus exactement au domaine Cter de FtsK.

Nous pouvons remarquer que la recombinaison avec les XerCD_{V.ch.} devient dépendante de RecA une fois chez *E. coli*, et inversement les XerCD_{E.coli} deviennent indépendantes de RecA pour la recombinaison une fois chez *V. cholerae*. Afin de vérifier que la raison pour laquelle les XerCD_{V.ch.} deviennent dépendantes de RecA n'est pas parce que la protéine FtsK de *E. coli* active moins bien les recombinases de *V. cholerae*, nous avons également testé des protéines FtsK hybrides. Pour ces versions hybrides, les domaines Cter des deux espèces ont été intervertis. Bien qu'une diminution soit observée en présence des XerCD_{V.ch.} et avec FtsKC_{vib}, l'activation de la recombinaison reste toujours fortement dépendante de RecA chez *E. coli*.

Ces résultats suggèrent donc que notre hypothèse de départ est fautive et que le fait que la recombinaison *dif* soit dépendante ou non de RecA, n'est pas le seul fait des recombinases Xer.

Suite à ces premiers résultats nous avons supposé que ces différences pouvaient résulter du fait que la protéine FtsK est plus souvent en contact avec les sites *dif* chez *V. cholerae* que chez *E. coli*. En effet ces deux bactéries possèdent des chorégraphies de ségrégation des chromosomes fils issus de la réplication, très différentes. Chez *E. coli* l'organisation du chromosome dans la cellule est transversale : avec l'*ori* et le Ter situés au milieu de la cellule. Après leur réplication, les domaines Ter des deux chromosomes fils sont ségrévés très rapidement et migrent vers ce qui sera le milieu de la future cellule fille (pour revue sur la ségrégation des chromosomes bactériens voir *Possoz et al. 2012 [175]*). Chez *V. cholerae* l'organisation du chromosome dans la cellule est longitudinale. Les Ter des deux chromosomes fils restent plus longtemps ensemble et au niveau du septum de division avant de migrer aux trois quarts de la future cellule fille [176].

Les essais de recombinaison de cassettes chez *E. coli* et *V. cholerae* ont été réalisés en milieu riche LB. Dans un tel milieu, la vitesse de croissance cellulaire est plus importante et *E. coli* initie plusieurs cycles de réplifications ce qui n'est pas le cas de *V. cholerae*. Nous avons donc comparé l'excision de la cassette *dif_{E.coli}/dif_{E.coli}* chez *E. coli* en milieu riche LB (croissance rapide) et en milieu pauvre (M9) ; milieu où la vitesse de croissance de la bactérie devrait être moins rapide (voir Figure 4.5).

On remarque dans un premier temps que le pourcentage d'excision de cassettes chez *E. coli* est augmentée en milieu minimum. Cela suggère que lors d'une croissance ralentie (par rapport au milieu riche), les Ter restent plus longtemps au septum de division car sont ségrévés moins vite. En accord avec l'hypothèse émise ; la dépendance à RecA de la recombinaison Xer est significativement réduite. Pris ensemble ces résultats suggèrent que la dépendance à RecA de la recombinaison Xer est liée à la vitesse de

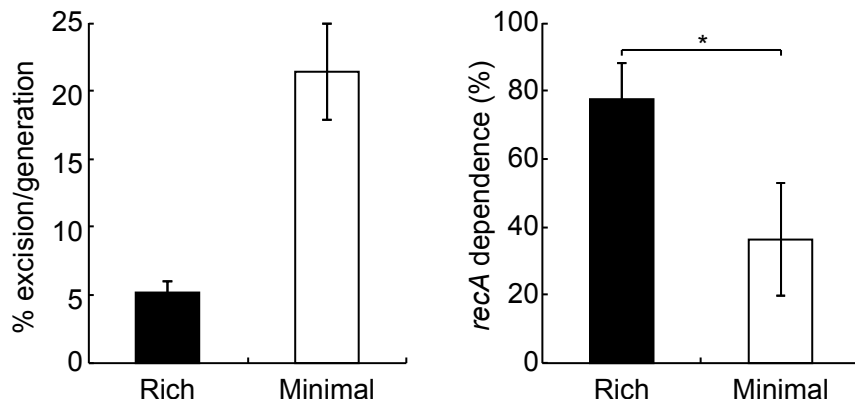


FIGURE 4.5 – Représentation graphique de l’excision de cassette *dif/dif* en milieu riche versus milieu minimum chez *E.coli*. **Gauche** : Graphique représentant le pourcentage d’excision de cassette par génération chez *E.coli* en milieu minimum (M9) ou milieu riche (LB). **Droite** : Graphique représentant la dépendance à *RecA* pour l’excision de la cassette *dif_{E.coli}/dif_{E.coli}* par recombinaison avec les *E.coli*Xer. * : significativement différent (t test avec $p= 0.0016$)

croissance de la cellule et de ségrégation des domaines Ter. FtsK étant un protéine ancrée au septum de division, plus les Ter quittent rapidement le septum de division, moins FtsK peut rencontrer les synapses *dif*/Xer pour les activer.

4.2.2 La séparation des Ter de part et d’autre du septum de division dépend de la vitesse de croissance chez *E. coli* mais pas *V. cholerae*

Le test d’excision de cassettes est un outil génétique indirect et insuffisant pour tirer des conclusions sur la vitesse de ségrégation des Ter en dehors du septum de division. Dans un second temps nous avons donc comparé la localisation des Ter des chromosomes de *V. cholerae* ou *E. coli* par microscopie à fluorescence. (voir matériel et méthode pour le marquage du Ter)

Localisation des Ter (ChrI) de *V.cholerae* en condition de croissance lente et rapide :

Les snapshot (captures instantannées) réalisés sur *V. cholerae* en conditions de croissance lente (milieu M9) révèlent que 97% des cellules observées présentent un seul spot correspondant au Ter (voir Figure 4.6 en haut à gauche). Dans les cellules qui viennent de naître (de petite taille) ces spots sont répartis majoritairement aux 1/4 et 3/4 de la cellule (comme décrit dans A. David et al. [177]) puisque les snapshot ne permettent pas d'orienter les cellules. Plus les cellules sont de grande taille (et tendent donc vers l'état de division) plus ces spots sont localisés au niveau du milieu de la cellule : lieu de formation du futur septum de division cellulaire. Ce sont majoritairement les cellules de grande taille qui présentent deux spots et donc deux Ter ségrégués.

À présent si nous nous intéressons à la ségrégation des spots Ter au moment de la constriction du septum nous remarquons qu'en condition de croissance lente, la majorité des Ter (78%) ne sont toujours pas ségrégués et sont localisés au milieu de la cellule, au niveau du septum de division. Dans les 22% de cas où les Ter sont ségrégués en deux spots, ces derniers restent au septum de division.

En condition de croissance rapide, le même type de profil général est obtenu. Les Ter migrent plus tôt au milieu de la cellule par rapport à sa taille. Il y a sensiblement plus de cellules avec deux spots (12% contre 3% en conditions de croissance lente), mais là encore les Ter ségrégués restent au milieu de la cellule même après début de la constriction.

Ces résultats suggèrent que dans le cas de *V. cholerae* les Ter des deux chromosomes fils issus de la réplication restent à proximité du septum de

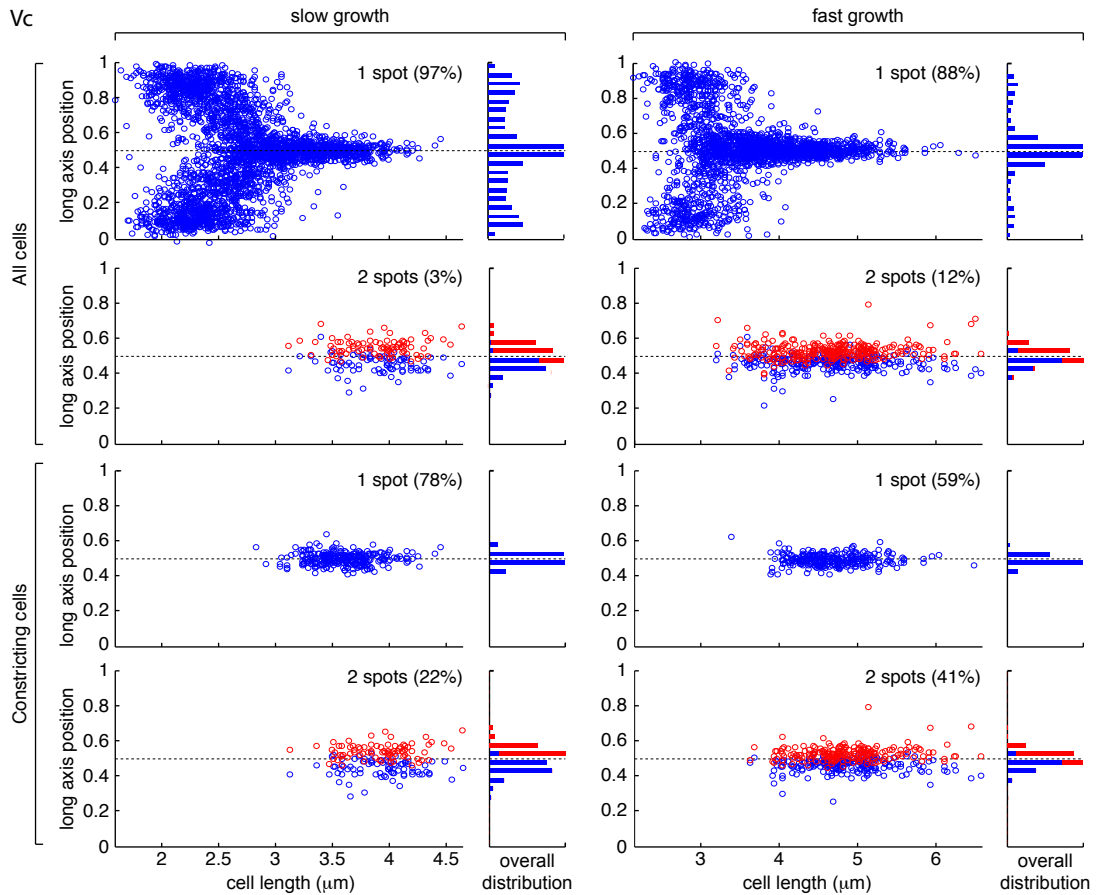


FIGURE 4.6 – Représentation graphique des résultats de snapshot pour la localisation des Ter de *V. cholerae* en condition de croissance lente (M9) et rapide (M9+10% de LB). La ligne en pointillés représente le milieu de la cellule.

division cellulaire; et cela même en condition de croissance rapide. FtsK est actif au moment de la constriction [57]. Il peut donc agir sur l'ADN des Ter situés au septum et activer la recombinaison Xer en milieu riche comme en milieu pauvre.

Localisation des Ter de *E.coli* en condition de croissance lente et rapide :

Les snapshot réalisés sur *E. coli* en conditions de croissance lente (milieu M9) révèlent que 80% des cellules observées présentent un seul spot correspondant au Ter (voir Figure 4.7 en haut à gauche). Le déplacement des Ter au milieu de la cellule est plus rapide et moins évident que dans le cas de *V. cholerae*. Là encore on observe deux spots dans les cellules de grande taille, mais ces derniers semblent moins proches du milieu de la cellule (la distributivité est plus étalée que dans le cas de *V. cholerae*).

En début de constriction, la majorité des cellules présentent deux spots (94%) localisés de part et d'autre du milieu de la cellule. Les Ter ségrégés quittent donc très tôt le milieu de la cellule et cela avant le début de la constriction. En conditions de croissance rapide plus de la moitié des cellules ont 2 spots ou plus. Ces derniers sont ségrégés loin du milieu de la cellule même dans les cellules de petite taille (par rapport à la taille des cellules : dès les cellules jeunes les Ter son ségrégés). Lors du début de la constriction quasiment toutes les cellules ont leurs Ter ségrégés et loin du septum de division. Leur position suggère même qu'ils se trouvent déjà au niveau de ce qui sera le milieu des la futures cellules filles.

Pour vérifier et comparer les données de croissance en conditions lente ou rapide notre équipe a réalisé des films suivant la localisation du Ter au cours d'un cycle de division cellulaire, sur plusieurs lignages (voir Figure 4.8). La comparaison des profils obtenus pour le Ter avec les données de "bright field" nous montre clairement qu'en conditions de croissance lente le début de constriction précède la ségrégation des Ter de part et d'autre du milieu de la cellule. En conditions de croissance rapide, les Ter dupliqués quittent le milieu de la cellule bien avant le début de la constriction du septum.

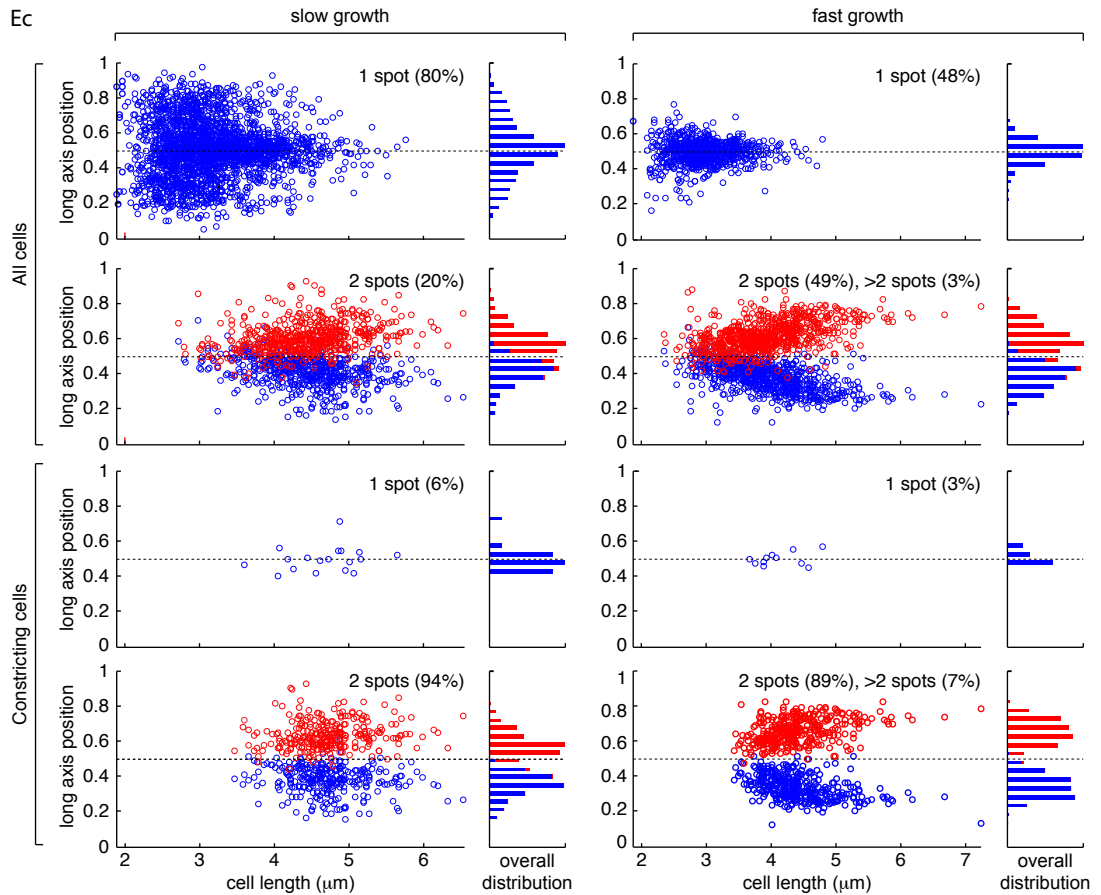


FIGURE 4.7 – Représentation graphique des résultats de snapshot pour la localisation des Ter de *E.coli* en condition de croissance lente (M9) et rapide (M9+10% de LB). La ligne en pointillés représente le milieu de la cellule. (nombre de cellules par conditions > 2000)

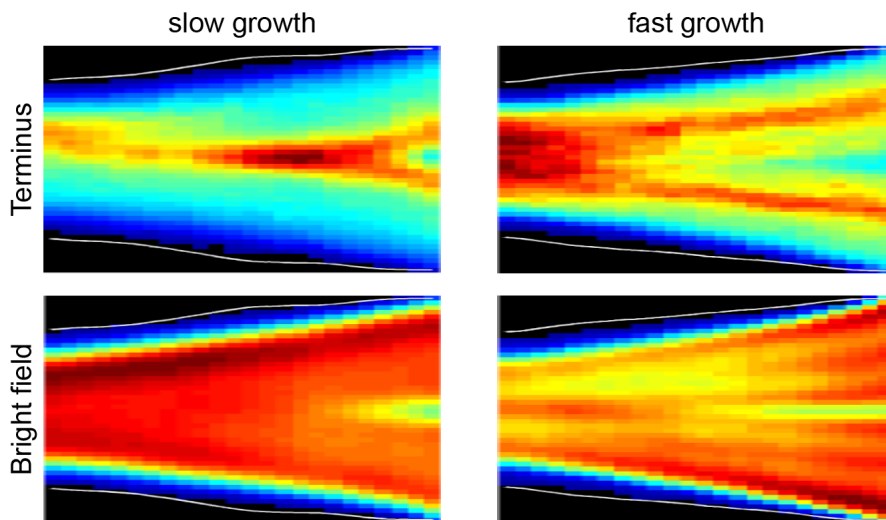


FIGURE 4.8 – Démographe représentant la localisation relative du Ter de *E. coli* au court du cycle cellulaire, en condition de croissance lente ou rapide. 100 lignages ont été regroupés pour les conditions de croissance lente et 45 lignages pour les conditions de croissance rapide. L'échantillon de couleurs allant du bleu au rouge foncé indique l'intensité de fluorescence avec bleu : minimum et rouge foncé : maximum.

Ces résultats suggèrent que chez *E. coli* la vitesse de croissance joue sur le temps passé par les Ter au niveau du septum de division. Au cours d'un cycle cellulaire en milieu riche, les Ter restent moins longtemps au milieu de la cellule, au niveau de la formation du septum de division. La protéine FtsK transloque donc peu l'ADN des chromosomes monomériques. Par contre en cas de formation d'un dimère de chromosomes par recombinaison homologue, la ségrégation entre les deux cellules filles ne peut pas se faire tant que la CDR n'a pas eu lieu. L'ADN du dimère est piégé au niveau du septum de division et FtsK peut se charger dessus. Il est alors capable d'activer la recombinaison Xer entre deux sites *dif*.

4.3 Discussion

Dans cette partie nous avons démontré que chez *V. cholerae*, la constriction de la paroi bactérienne commence avant la complète ségrégation des Ter et leur exclusion en dehors de la zone d'apparition du septum de division. FtsK étant actif au moment de la constriction [57], tout ADN situé à ce niveau peut être transloqué par Ftsk. Ainsi, chez *V. cholerae* FtsK agit sur l'ADN du Ter dans la majorité des cellules. Ceci explique pourquoi chez *V. cholerae*, FtsK peut activer la recombinaison d'une cassette contenant deux sites *dif* en répétition directe, de manière RecA indépendante.

Dans le cas de *E. coli*, la ségrégation des Ter et leur éloignement de la zone de formation du septum de division, se fait avant le début de la constriction (dans la majorité des cas). FtsK n'est pas actif sur ces ADN. Le seul moyen pour FtsK d'activer la recombinaison Xer est qu'il y ait un problème de ségrégation tel que la formation d'un dimère de chromosomes. Ceci explique pourquoi chez *E. coli* la recombinaison Xer est dépendante

de RecA mais également de la vitesse de croissance.

Comme spécifié au début de cette partie ces résultats s'inscrivent dans un article en cours d'écriture. Dans les résultats non présentés nous avons étudié les différences de prises en charge du domaine Ter d'*E. coli* dans différentes conditions de croissance.

Concernant l'étude liée à TLC, nous ignorons toujours pourquoi XafT n'est pas capable d'activer XerD_{*E.coli*} malgré le fait qu'il interagisse avec. Cependant nous notons Figure 4.4 que chez *E. coli*, la dépendance à RecA avec les Xer de *V. cholerae* est plus importante lors de l'utilisation de FtsKC_{*E.coli*} que lors de l'utilisation de FtsKC_{*V.ch.*} (statistique : $p = 0.0056$ (test ANOVA)). Ceci suggère que le FtsK de *V. cholerae* semble mieux activer XerCD_{*V.ch.*} que le FtsK de *E. coli*. Il est donc possible qu'il y ait tout de même certaines divergences concernant l'activation des Xer entre ces deux espèces, bien que pour l'instant nous n'ayons pas de preuves solides.

Matériel et méthode

Test d'intégration *In vivo* de TLC : Pour ces essais une forme de pTLC non répliquative mais capable d'intégration a été utilisée. Les plasmides d'intérêts ont été transformés dans des donneuses *E. coli* β 2163. Les cultures des donneuses (LB+DAP 0.3mM) et receveuses *V. cholerae* (LB) ont été faites à 37°C jusqu'à DO \approx 0.3-0.6 et mélangées dans les proportions 1 donneuse pour 10 receveuses. La conjugaison vers les receveuses *V. cholerae* a été réalisée sur 3h à 37°C sur boîtes LB-agar+DAP. Après incubation et resuspension en LB les différentes dilutions ont été étalées sur boîtes LB+Cm(3 μ g/ml)+Xgal(40 μ g/ml). Un plasmide contenant la version complète répliquative de TLC a été utilisé comme contrôle de conjugaison et

pour estimer la fréquence d'intégration.

Purification des protéines et essai de pull down : voir matériel et méthode chapitre II.

Tests d'excision de cassettes :

Pour *V. cholerae* : 0.2mM d'IPTG ont été utilisés pour réprimer la transcription de XerCD. L'induction de la transcription de XerCD a été faite avec 0.1% d'arabinose. Des pré-cultures dans 5ml de milieu ont été réalisées à partir de colonies fraîches jusqu'à $0.2 < DO_{600} < 0.5$. Puis les différentes cultures ont été diluées dans le milieu d'intérêt supplémenté d'arabinose à une $DO_{600}=0.02$ finale. L'incubation a été réalisée à 37°C sous agitation, pendant 3h. Les différentes dilutions ont été étalées sur boîtes LB+Xgal(80µg/ml)+IPTG(0.2mM)

Pour *E. coli* : les souches contenant la cassette *lacZ-dif_E.coli* et rendues chimio-compétentes (au chlorure de rubidium) ont été transformées avec un plasmide contenant XerCD sous contrôle du P_{ara} . Le T0 a été étalé (sur LB+Amp (100µg/ml)+Xgal(80µg/ml)+IPTG(0.2mM) pour sélectionner celles ayant reçu le plasmide d'induction des Xer) puis 200µL ont été inoculés dans un volume final de 5mL de milieu d'intérêt supplémenté d'arabinose 0.1%. Les cultures ont été incubées à 37°C sous agitation pendant 16h, et les différentes dilutions étalées.

Milieux de cultures : M9 minimal medium = 1x M9 salts, 0.2% fructose, 1 mM MgSO₄, 0.1 mM CaCl₂, 1 µg/ml Thiamine. Correspond au milieu minimal utilisé pour les tests d'excision de cassette et les conditions de croissance lente en microscopie. Milieu riche = milieu Luria Berthani. Milieu de croissance rapide pour la microscopie = milieu minimum M9 +

casaminoacides + Glucose + Thiamine + 10% de LB.

Expériences de Microscopie : Les cellules ont été cultivées en milieu liquide jusqu'à la phase exponentielle de croissance puis déposées sur une matrice d'agar 1% (ultrapure agarose Invitrogen). Pour les analyse en snapshot, l'acquisition des images a été réalisée en utilisant le microscope Leica DM6000-B. Pour les analyses de films (time-lapse), le microscope Axio observe spinning disk de Zeiss a été utilisé, couplé à une caméra Evolve 512 EMCCD (Roper Scientific). Pour les films, une image a été prise toutes les 2 min en milieu de condition de croissance rapide (M9-riche) et toutes les 4 min en milieu de croissance lente (M9 milieu minimum). L'analyse des données de microscopie a été réalisée sous Matlab comme publié précédemment [178, 179].

Milieux de croissance pour la microscopie :

Milieu de croissance lente (M9 milieu minimum) : 1x M9 salts, 0.2% fructose, 1 mM MgSO₄, 0.1 mM CaCl₂, 1 μ g/ml Thiamine.

Milieu de croissance rapide (M9-riche) : 0.2% glucose, 1 mM MgSO₄, 0.1 mM CaCl₂, 1 μ g/ml Thiamine, 0.1% CAA, 10% LB.

Table S1 : souches de *V.cholerae* utilisées

Nom	Propriétés	Source
CMV42	souche N16961 ΔlacZ , ΔXerD : :zeo-FRT δXerC : :vibrio XerCD ara inducible + Δdif1 : : dif1-lacZ α - dif1-lacZ β cat(1kb)	This study
CMV43	souche N16961 strain δlacZ , ΔXerD : :zeo-FRT, ΔXerC : :E.coli XerCD ara inductible + δdif1 : : dif1-lacZ α - dif1-lacZ β cat(1kb)	This study
CMV44	souche N16961 strain ΔlacZ , δrecA : :kan, ΔXerD : :zeo FRT ΔXerC : :vibrio XerCD ara inductible + Δdif1 : : dif1-lacZ α -dif1-lacZ β cat(1kb)	This study
CMV45	souche N16961 strain ΔlacZ , ΔrecA : :kan ΔXerD : :zeo-FRT ΔXerC : :E.coli XerCD ara inductible + δdif1 : : dif1-lacZ α dif1-lacZ β cat(1kb)	This study
EGV289	ΔlacZ , ΔXerD + Δdif1 : : dif1-lacZ α dif1-lacZ β cat(1kb) + ΔXerC : :vibrio XerCD ara inductible + ftsK γ :aadA	This study
EGV291	ΔlacZ , ΔXerD : :zeo FRT ΔXerC : :E.coli XerCD ara inductible + Δdif1 : : dif1-lacZ α dif1 lacZ β cat(1kb) + ftsK γ :aadA	This study
EPV379	ΔlacZ , ΔXerD , ΔXerC : :vibrio XerCD ara inducible, Δdif1 : : <i>dif</i> Ecoli-lacZ <i>dif</i> Ecoli lacZ(1kb)	This study
EPV383	EPV379 ΔrecA : :kan	This study
EPV382	ΔlacZ , ΔXerD , ΔXerC : :E.coli XerCD ara inducible, Δdif1 : : <i>dif</i> Ecoli-lacZ <i>dif</i> Ecoli lacZ(1kb)	This study
EPV385	EPV382 ΔrecA : :kan	This study
ADV78	N16961 ChapR ΔlacZ (LacImcherry) + LacOarray-Kan sur le chromosome I à proximité de <i>dif1</i>	

Table S2 : souches de *E.coli* utilisées

Nom	Propriétés	Source
EG303	MG1655 Δ lacZ xerD : :kan xerC : :gm + Δ dif : : dif1 lacZ α dif1 lacZ β (1kb)	This study
EG304	MG1655 Δ lacZ xerD : :kan xerC : :gm+ Δ dif : : dif lacZ α dif lacZ β (1kb)	This study
EG315	MG1655 Δ lacZ recA : :cml xerD : :kan xerC : :gm + Δ dif : : dif1 lacZ α dif1 lacZ β (1kb)	This study
EG316	MG1655 Δ lacZ recA : :cml xerD : :kan xerC : :gm + Δ dif : : dif lacZ α dif lacZ β (1kb)	This study
	MG1655 Δ lacZ ydcV : :parST1	stock Boccard lab
	MG1655 Δ lacZ ydcV : :parST1 recA : :cml	stock Boccard lab
	MG1655 Δ lacZ ydcV : :parST1 ftsKATPmutant : :cml	stock Boccard lab
	MG1655 Δ lacZ ydcV : :parST1 matP : :cml	stock Boccard lab

Table S3 : Plasmides principaux

Nom	Dérivé de	Utilisation
pCM54	pUC18	transformation naturelle pour mettre les vibXerCD au locus <i>xerC</i> chez <i>V.cholerae</i>
pCM55	pUC18	transformation naturelle pour mettre les e.coliXerCD au locus <i>xerC</i> chez <i>V.cholerae</i>
pCM11	pUC18	transformation naturelle pour remplacer <i>dif1</i> par <i>lacZ-dif1-lacZ</i> chez <i>V.cholerae</i> .
pGD186	pUC18	remplacer dif1 par la cassette dif1-lacZ α dif1-lacZ β cat(1kb)
pEG292	pUC18	délétion de vibXerD par transformation naturelle
pMEV97	pSW23T	délétion de <i>recA</i>
pAD23	pUC18	remplacement de <i>dif1</i> par tet-bla(zeoR)-tet chez <i>V.cholerae</i>
pEG378	pUC18	remplacement par transformation naturelle du Cter de vibFtsK par le Cter de e.coliFtsK (hybride)
pFHC2973	pUC18	plasmide portant ygfP - parB-pMT1 pour reconnaître les sites parST1 au Ter de <i>E.coli</i> utilisée pour la microscopie

Chapitre 5

Discussion générale

5.1 XafT active-t'il véritablement XerD ?

La recombinase XerD de *V. cholerae* a été reportée comme moins restreinte à l'activation par FtsK que celle de *E. coli*. En effet des essais de recombinaisons en intra-plasmidique entre deux sites *dif* ont mis en évidence une activation de XerD indépendamment de FtsK. Ces études ont également montré que des modifications de séquences au sein d'un site *dif* changent l'efficacité de cette voie [31]. Ainsi en présence des XerCD_{*V.ch.*} *in vivo*, deux sites *dif_{ecoli}* recombinent d'avantage de manière FtsK indépendante que deux sites *dif1* eux mêmes moins restreints que des sites *dif2* (voir Figure 5.1).

Il est probable que ce relâchement du contrôle de XerD résulte du fait de devoir recombiner deux sites *dif* différents situés sur chacun des deux chromosomes de *V. cholerae*, avec les mêmes XerC et XerD. Aux vues de ces résultats nous nous sommes demandé si les bases dégénérées du site *attPTLC* étaient nécessaires à sa recombinaison FtsK indépendante. Nous avons démontré dans le Chapitre II, que ce n'était pas le cas étant donné que XafT active également la recombinaison entre deux sites *dif1*.

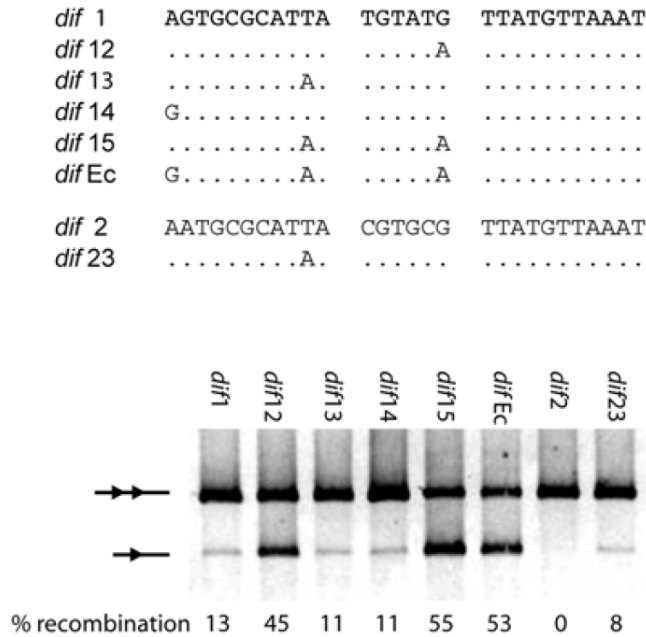


FIGURE 5.1 – **Recombinaison XerD indépendante de FtsK chez *V.cholerae* et sur des sites hybrides *dif***. En haut les différents sites *dif* utilisés. Les pointillés indiquent les bases équivalentes au site *dif1* ou *dif2* dans le cas de *dif23*. En bas : gel de recombinaison intraplasmidique avec le substrat (deux flèches) et le produit résultant de l'excision de l'ADN situé entre les deux sites (une flèche). Tiré de M.-E. Val et al. 2008 [31].

Néanmoins, les sites *dif1* chargés par XerCD_{*V.ch.*} sont capables de voie XerD indépendante de FtsK à très faible efficacité. Il est alors possible que XafT se contente de stabiliser les HJ créés par cette voie tout comme EndoIII bloque les HJ [139], ou comme les hexapeptides sont capables de le faire sur des HJ spécifiques [53, 55, 54, 52]. Cette possibilité est d'autant plus envisageable que XafT possède dans le début du DUF3653 une forte concentration d'acides aminés aromatiques ; aa caractéristiques des hexapeptides (voir Figure 5.2). De plus on observe une accumulation de la HJ *in vitro* comme *in vivo* (voir Figures 3.4 et 3.5) [30].

J'ai alors étudié la recombinaison entre deux sites *dif* dans différentes

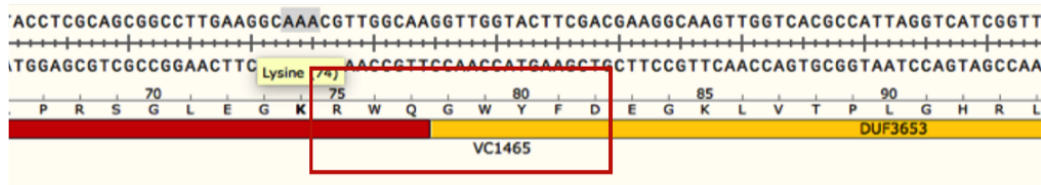


FIGURE 5.2 – **Représentation partielle de l’ORF VC1465 et de son cadre de lecture codant pour XafT.** Le domaine DUF3653 est indiqué en jaune. La séquence protéique contenant une plus forte concentration en aa aromatiques est encadrée en rouge.

conditions pour déterminer si la fonction de XafT se limite à bloquer les HJ résultant de l’activité résiduelle de XerD.

5.1.1 Recombinaison *in vitro* avec différents pourcentages de glycérol

Lors des premiers essais de recombinaisons Xer réalisés chez *E. coli*, l’activité catalytique de XerC n’a pu être observée qu’en présence de 40% de glycérol. Au cours de nos essais de recombinaison nous avons utilisé 10% final de glycérol. Partant de l’idée que de fortes concentrations de glycérol augmente l’activité des recombinases Xer, nous avons comparé l’efficacité de recombinaison XafT dépendante ou non en 10% ou 40% de glycérol. Si une activité résiduelle de XerD se trouvait accrue en 40% de glycérol et que XafT se contente de bloquer les HJ, nous devrions voir plus de recombinaison. Cependant nous ne pourrions exclure que XafT est simplement plus actif à de fortes concentrations en glycérol (voir Figure 5.3).

Nous remarquons qu’en 10% de glycérol avec les Xer de *V. cholerae* une fine bande correspondant à la HJ est formée en absence de XafT. Cette bande est toujours présente avec le mutant XerDKQ mais ne l’est plus lors de l’utilisation du mutant XerCKQ. Il s’agit des HJ formées par

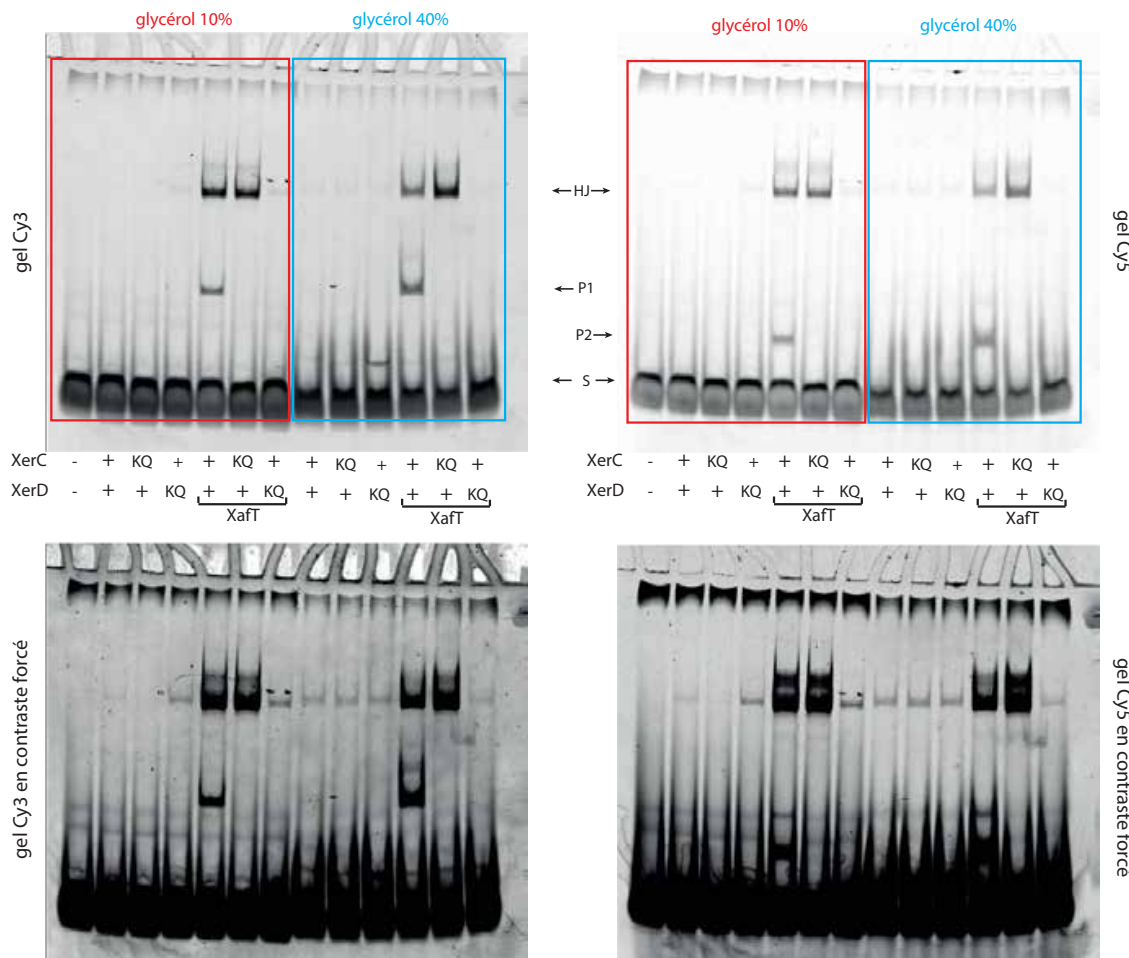


FIGURE 5.3 – Recombinaison *in vitro* entre deux sites *dif1* en différentes concentrations de glycérol. (+) et (-) indiquent l'ajout ou non des protéines XerC, XerD et XafT. KQ : mutant catalytique. HJ : jonction de Holliday. P : produit 1 and 2. S : substrat. *= marqué Cy3, Cy5.

l'échange de brins catalysé par XerC. En opposition avec les Xer d'*E.coli* nous sommes capables de les voir dès 10% de glycérol. En présence de XafT, en 10% de glycérol, on observe une forte quantité de HJ, mais l'utilisation de XerDKQ ne donne que la HJ formée par l'activité de XerC et équivalente aux quantités observées en absence de XafT. XafT ne bloque donc pas les HJ faites par XerC. En 40% de glycérol nous sommes à présent capables de détecter des HJ résultant de l'activité résiduelle de XerD et l'activité

de XerC. De fortes concentrations de glycérol permettent donc de voir les HJ faites par l'activité résiduelle de XerD. Cependant l'efficacité de recombinaison en présence de XafT en 40% de glycérol n'est pas augmentée. Ces résultats suggèrent que XafT n'est pas seulement un bloqueur de HJ et activerait XerD. Néanmoins ils n'indiquent qu'une tendance et ne prouvent pas que XafT active.

5.1.2 Recombinaison *in vitro* avec des sites *dif_{E.coli}*

Nous avons déjà évoqué les travaux de M.-E. Val et al. [31] qui ont démontré qu'un site *dif_{E.coli}* recombine d'avantage de manière XerD indépendante de FtsK qu'un site *dif1*. Nous avons donc fait l'hypothèse que si XafT bloque uniquement les HJ, la quantité de HJ formées en présence de XafT sur un site *dif_{E.coli}* devrait être supérieure à celle de *dif1*, *in vitro*. J'ai donc testé la recombinaison *in vitro* sur des sites *dif_{E.coli}* (voir Figure 5.4).

Bien que l'on obtienne la formation de HJ, en présence de XafT et XerCD_{V.ch.} sur des sites *dif_{E.coli}*, nous remarquons que l'efficacité de recombinaison est inférieure à celle que nous avons pu observer au Chapitre II avec des sites *dif1*. Ces résultats vont également dans le sens d'une activation de XerD par XafT.

5.2 VGJ ϕ possède une protéine apparentée à XafT

Lors des premières recherches concernant les DUF3653 dans les bases de données Pfam, l'ORF136 de VGJ ϕ était prédite comme codant pour une protéine avec un DUF3653. Nous avons été surpris de trouver les IMEXs

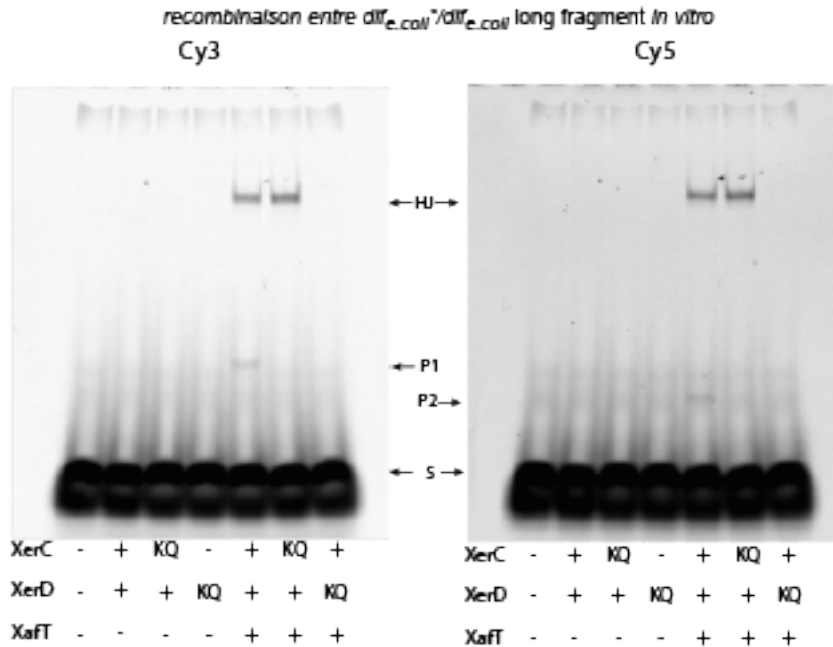


FIGURE 5.4 – Recombinaison *in vitro* entre deux sites *dif* d' *E.coli* et avec les recombinases XerCD de *V.cholerae*. (+) et (-) indiquent l'ajout ou non des protéines XerC, XerD et XafT. KQ : mutant catalytique. HJ : jonction de Holliday. P : produit 1 and 2. S : substrat. *= marqué Cy3, Cy5

VEJ ϕ , VGJ ϕ et VSK ϕ dans cette liste, étant donné que leur voie d'intégration utilise un premier échange de brins catalysé par XerC. De plus des études préliminaires réalisées sur VGJ ϕ nous indiquaient que l'efficacité d'intégration d'un vecteur portant *attPVGJ* seul était inférieure à celle du phage partiel (déléte pour les gènes codant pour les protéines de la capsid mais possédant toujours l'ORF136).

J'ai alors réalisé une mutation non-sens dans l'ORF136 et testé l'intégration d'une telle version d'un pVGJ répliatif (voir Figure 5.5). Comme VGJ ϕ se réplique une fois dans la bactérie, son intégration peut avoir lieu à n'importe qu'elle moment au cours de la croissance de la colonie bactérienne. Ceci donne lieu à des colonies avec des secteurs blancs ou en étoile avec un coeur bleu en cas d'efficacité d'intégration de 100% sur le temps

regardé (ici 36h).

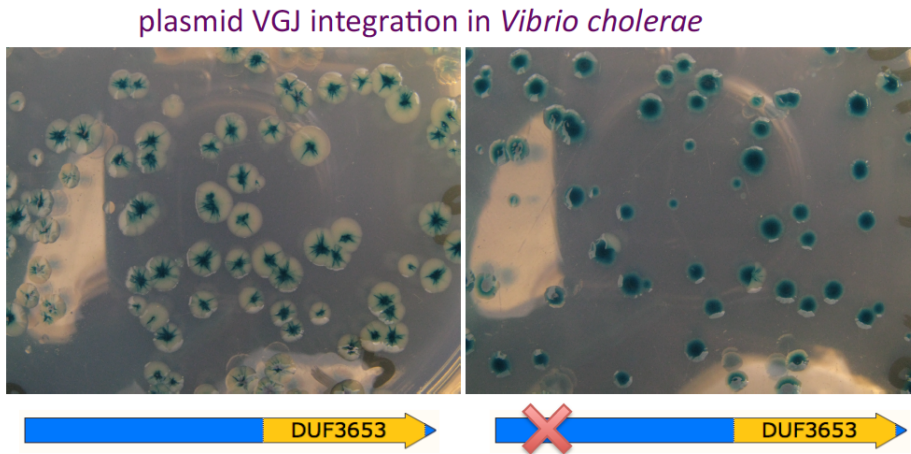


FIGURE 5.5 – **L'ORF136 est impliquée dans l'intégration de VGJ.** Photographie de colonies avec le crible blanc/bleu permettant de voir de manière qualitative l'efficacité d'intégration de VGJ au cours de la croissance d'une colonie. L'ORF136 code pour une protéine symbolisée par une flèche bleue en dessous de chaque photographie. La croix rouge indique une inactivation de la protéine (codon stop dans l'ORF136).

On remarque que le VGJ réplcatif contenant la version sauvage de l'ORF136 s'intègre à 100% sur 36h alors que celui possédant une version mutée voit son efficacité d'intégration diminuer fortement (voir Figure 5.5 droite). Une complémentation fonctionnelle en *trans* restaure complètement l'efficacité d'intégration et a confirmé que c'est bien la protéine codée par ce gène qui a un rôle dans la recombinaison (données non montrées). Par la suite j'ai pu vérifier les points suivant lors d'essais d'intégration (données non montrées) :

- l'ORF136 ne permet pas l'intégration de TLC
- VC1465 ne permet pas l'intégration de VGJ
- L'échange des domaines DUF3653 entre les protéines encodées par VC1465 et ORF136 donne lieu à des protéines hybrides ne permet-

tant l'intégration ni de TLC ni VGJ.

Il semble donc que ces protéines soient spécifiques du phage ou du mécanisme d'intégration pour lequel elles agissent. De plus une mise à jour du profil HMM dans la base de donnée Pfam ne considère plus aujourd'hui les phages types VGJ comme possédant des protéines avec un DUF3653. Il est donc possible que ce domaine soit plus éloigné et n'ai pas tout à fait la même fonction. Ceci serait cohérent avec les divergences de voies d'intégrations entre ces deux types d'IMEXs. VGJ posséderait donc lui aussi son facteur phagique d'intégration, ce qui expliquerait pourquoi l'efficacité d'intégration de VGJ ϕ n'est pas affecté dans une souche mutante pour EndoIII comme c'est le cas pour CTX ϕ [139].

5.3 Les îlots génétiques de *Neisseria* : une quatrième catégorie d'IMEXs ?

Comme nous l'avons évoqué dans l'introduction, les IMEXs ont été répartis en trois catégories basées sur leur site d'attachement *attP* et de manière fortement corrélée, leur stratégie d'intégration. Les IMEXs de type TLC sont ceux possédant un site de fixation pour XerD dégénéré par rapport à la séquence consensus du site *dif* ciblé. Cependant le niveau de dégénérescence des sites *attP* peut varier et rien ne prédit que les sites présentant peu de bases mutées, utilisent un mécanisme d'intégration indépendant de FtsK et que ce mécanisme soit le même que celui de TLC.

La question se pose notamment pour les IMEXs de type îlot génétique (GI) retrouvés chez *Neisseria gonorrhoeae* (GGI) et *meningitidis*. Alors que les sites *dif* des *Neisseria* sont très conservés (voir Figure 5.6), trois différents types de sites *attP* ont été observés dans les GI intégrés (voir Figure 5.6 et commentaire d'article ci-après).

	XerC		XerD	
<i>difA1</i>	AGTTCGCATAA	TGTATA	TTATGTTAAAT	(Gc, Mg, La)
<i>difA2</i>	AGTTCG^tATAA	TGTATA	TTATGTTAAAT	(Gc)
<i>difA3</i>	AGTTCGCATAA	TaTATA	TTATGTTAAAT	(Mc)
<i>difA4</i>	AaTTCGCATAA	TGTATA	TTATGTTAAAT	(La)
<i>attP1</i>	AGTTCGCATAA	TGTATA	TTATGcaAtcT	(Gc)
<i>attP2</i>	AGTTCGCATAA	TGTATA	TagaGTgctgg	(Mc)
<i>attP3</i>	AGTTCGCATAA	TaTATA	TTATGcgAAcT	(Mc)

FIGURE 5.6 – Alignement des sites *dif* présents chez *Neisseria* et des sites *attP* des GI ciblant cette bactérie. Gc = *N. gonorrhoeae*, Mc = *N. meningitidis*, La = *N. lactamica*, indiquent dans quelles espèces les différents sites sont trouvés. Les sites de fixation de XerC et XerD sont indiqués par une ligne noire. Les variations par rapport à la séquence consensus des sites *dif* de *Neisseria* sont indiquées en minuscules. En rouge sont celles présentes sur les sites *attP* des GI qui diffèrent du site *dif* cible. Figure modifiée d'après N. M. Dominguez et al. [161]

Alors que 80% des souches de *N.gonorrhoeae* et quelques souches de *N.meningitidis* arborent un IMEXs de type GI, les sites d'attachement de ces derniers semblent différer. Certains ont un site de fixation de XerD avec peu de mutations (3pb) alors que d'autres en ont autant que *attPTLC* (8pb). Il est donc possible que XerD se fixe bien sur un tel site et n'ait pas besoin d'une protéine accessoire pour stabiliser cette interaction. Cependant si un tel facteur n'existe pas pour limiter l'excision, ces IMEXs devraient être rapidement excisés du chromosome. N. M. Dominguez et al. [161] proposèrent que ces sites ont subi des mutations post intégration qui ont conduit à la stabilité du GI dans la souche : Ces mutations impacteraient fortement la recombinaison. Cependant si une telle hypothèse est vraie il est étonnant de noter des similitudes au niveau des mutations observées entre différentes souches de *Neisseria*. Tout d'abord il est surprenant que seul le site de fixation de XerD soit muté. Des mutations dans la région centrale auraient stabilisé d'avantage le GI. De plus les sites *attP1* et *attP2* sont très similaires alors qu'ils sont présents dans deux espèces différentes. Il est donc plus probable que ces sites *attP* soient les formes intégratives utilisées par le GI.

Fournès et al. démontrent dans leur article qu'un tel site est effectivement affecté pour l'excision car la translocation de FtsK déstabilise la fixation d'un dimère XerCD sur un site du GGI, alors qu'il s'arrête au niveau d'un dimère chargé sur un *dif* de *Neisseria* [171]. Cette même équipe a également observé l'intégration d'un plasmide portant un des sites GGI via un événement de recombinaison FtsK dépendant (données non publiées). Cela soulève la question de comment un tel élément peut nécessiter FtsK pour son intégration, alors que par la suite elle limite son excision en inhibant la formation de la synapse. Il est possible que FtsK déstabilise le dimère de XerCD sur le site du GGI, mais pas une synapse contenant un

hétérotétramère. Lors d'évènements de recombinaison en intermoléculaire, le site du GGI est porté par un plasmide. FtsK ne transloque pas cet ADN, donc ne déstabilise pas le dimère de XerCD sur le site du GGI porté par le plasmide et peut activer la recombinaison.

Ces résultats suggèrent que le GGI pourrait représenter une nouvelle catégorie d'IMEXs s'intégrant en utilisant l'activation par FtsK en opposition à TLC. Néanmoins nous resterons précautionneux car ces essais ont d'une part été réalisés avec seulement le site *attP* du GGI et en absence du génome du GI. On ne peut donc pas exclure qu'un facteur d'intégration présent dans le GI soit absent de ces expériences. D'autre part la fusion γ XerD qui a été utilisée pour cette étude est sûrement constitutivement active.

Au sein du commentaire d'article qui suit, nous avons discuté ces différents aspects.

How Xer-exploiting mobile elements overcome cellular control

Caroline Midonet^a and François-Xavier Barre^{a,1}

Most strains of *Neisseria gonorrhoeae* (Ng), the causative agent of the sexually transmitted disease gonorrhoea, and a few strains of *Neisseria meningitidis* (Nm), which is responsible for a large number of meningitides, harbor a 57-kb horizontally acquired genetic element, the gonococcal genomic island (GGI) (1–3). Certain versions of the GGI are associated with disseminated gonococcal infection (1, 4). In addition, the GGI encodes numerous homologs of type IV secretion system genes, which are necessary for DNA secretion and facilitate natural transformation of the *Neisseria* (1, 2, 4). GGI are found integrated at the chromosomal dimer resolution site of their host chromosome, *dif*, and are flanked by a partial repeat of it, *dif*_{GGI} (Fig. 1A) (1, 5). The *dif* site is the target of two highly conserved chromosomally encoded tyrosine recombinases, XerC and XerD, which normally serve to resolve dimers of circular chromosomes through the addition of a crossover between directly repeated *dif* sites (6). This reaction raises questions on how GGI could be stably maintained (5). The results presented by Fournes et al. (7) in PNAS shed a new light on this apparent paradox.

The Xer machinery is highly conserved in bacteria. The *dif* sites consist of 11-bp XerC- and XerD-binding motifs, separated by an overlap region at the border of which recombination occurs (Fig. 1B). Recombination is under the control of a hexameric DNA pump, FtsK (Fig. 1C) (8). FtsK is a powerful translocase (9) and strips DNA from most proteins (10). However, a direct interaction between its extreme C-terminal domain, FtsKy, and the Xer recombinases stops it (Fig. 1C) (11, 12) and activates the exchange of a pair of strands by XerD catalysis when in the presence of a synaptic complex (Fig. 1C) (8, 11, 13). The exchange of a second pair of strands by XerC catalysis converts the resulting Holliday junction into product (Fig. 1C) (8, 13). FtsK belongs to the cell division machinery. It assembles at midcell when most of the chromosomal DNA has been replicated and segregated, which restricts recombination at *dif* to the time of cell division (14, 15) and to the chromosome replication terminus region (16, 17).

Numerous mobile elements have been shown to exploit Xer recombination. Plasmids use it for the

resolution of multimers, the formation of which compromises vertical transmission from mother to daughters by reducing the number of independently segregating plasmid units (18). Integrating mobile element exploiting Xer (IMEX) use it to insert into the *dif* site of one of the chromosomes of their host (19). In both cases, the FtsK control imposed on Xer recombination must be overcome, because the replication/segregation cycle of plasmids and the integration/excision cycle of IMEX should be independent from the cell cycle. Moreover, Xer recombination leads to the formation of plasmid multimers when they harbor a *dif* site (17, 20) and to the excision of the intervening DNA between directly repeated *dif* sites (17, 21). Correspondingly, the central region of plasmid sites seems to prevent FtsK-dependent XerD catalysis (Fig. 1B) (22), and the central region of the attachment sites of most IMEX lacks the necessary homology to stabilize XerD-mediated strand exchanges with *dif* (Fig. 1B) (23, 24). This is not the case for the central region of the different alleles of *dif*_{GGI} (Fig. 1D). The problem was most striking for the most common of these alleles, *dif*_{GGI1}, which differs from the neisserial *dif* by only 4 bp (Fig. 1D).

In PNAS, Fournes et al. (7) observe that the Ng Xer recombinases efficiently bound to *dif*_{GGI1}, synapsed it with *dif*_{Ng}, and catalyzed complete recombination reactions between the two sites when activated by Ng FtsKy. However, they noticed that recombination was reduced in the presence of the FtsK translocation module. The authors smartly hypothesize that FtsK translocation inhibited recombination by stripping Ng XerD from *dif*_{GGI1}, which they successfully verified in vitro.

It was previously suggested that GGI initially harbored true neisserial *dif* sites and that their stabilization resulted from mutations that occurred after their integration (5). Many different types of mutations, including mutations in the central region of the *dif* sites and mutations abolishing the binding of the recombinases to them, could impede Xer recombination. Why, then, should *dif*_{GGI1} harbor mutations that blocked FtsK-dependent recombination without affecting XerC and XerD binding and synapse formation? One of the *dif*_{GGI} alleles found in Nm strains, *attP*_{GGI2}, harbors

^aInstitute for Integrative Biology of the Cell, Université Paris-Saclay, CEA, CNRS, Université Paris Sud, 91198 Gif sur Yvette, France

Author contributions: C.M. and F.-X.B. wrote the paper.

The authors declare no conflict of interest.

See companion article on page 7882 in issue 28 of volume 113.

¹To whom correspondence should be addressed. Email: francois-xavier.barre@i2bc.paris-saclay.fr.

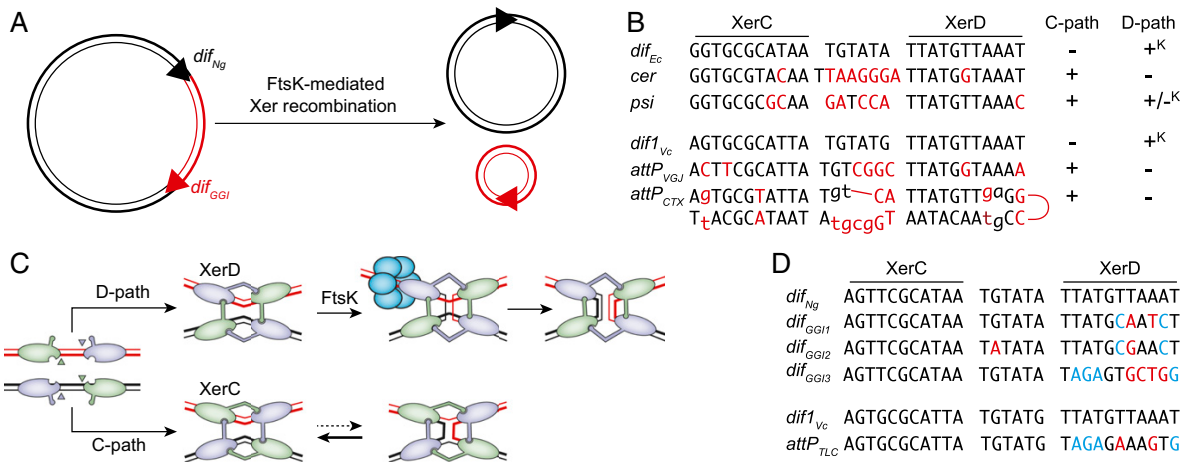


Fig. 1. (A) Schematic of XerCD-mediated excision of the GGI. Black double lines, *N. gonorrhoeae* chromosomal DNA; red double lines, GGI DNA; black triangles, *dif_{Ng}* and red triangle, *dif_{GGI}*. (B) Sequence alignment of the Xer recombination site of mobile elements and their cognate partner chromosomal *dif* site; *attP_{CTX}*, CTX ϕ attachment site; *attP_{VGJ}*, VGJ ϕ attachment site; *cer*, core dimer resolution site of plasmid ColE1; *dif_{Ec}*, *E. coli dif*; *dif1_{Vc}*, *V. cholerae* chr1 *dif*; and *psi*, core dimer resolution site of plasmid pSC101. Apart from *attP_{CTX}*, which is the stem of a forked hairpin from the single-stranded form of the genome of CTX ϕ , a single of the two DNA strands is represented in the 5' to 3' orientation from left to right. Bases of *cer* and *psi* that differ from *dif_{Ec}* and bases from *attP_{CTX}* and *attP_{VGJ}* that differ from *dif1_{Vc}* are indicated in red. Plus (+) and minus (-) signs indicate whether the sites can engage in recombination pathways initiated by XerC or XerD strand exchanges; +^K denotes FtsK-dependent recombination pathways. (C) Schematic of Xer recombination. XerD and XerC are represented in magenta and green, respectively. Following the Cre paradigm, the active pair of recombinases are drawn with their extreme C-terminal domains contacting the partner recombinases in cis. Blue circles represent the hexamer of FtsK. (D) Sequence alignment of *dif_{Ng}*, the three different types of *dif_{GGI}*, *dif1_{Vc}* and *attP_{TLC}*. Bases of the *dif*-like site of mobile elements that differ from their cognate *dif* partner are highlighted in color, with blue highlighting those that are identical in *dif_{GGI1}* and *dif_{GGI2}* and in *attP_{GGI3}* and *attP_{TLC}*.

two out of four of the bases that differentiate *dif_{GGI1}* from *dif_{Ng}*, which suggests that these changes were not randomly picked up (Fig. 1D, blue bases of *dif_{GGI1}* and *dif_{GGI2}*). Indeed, it is striking to note that *dif_{GGI2}* is fully palindromic and carries two XerC-binding arms (Fig. 1D). In contrast, 8 out of 11 of the bases of the XerD-binding arm of *dif_{GGI3}* differentiate it from the XerD arm of *dif* sites (Fig. 1D). The attachment site of a *V. cholerae* IMEX, the toxin-linked cryptic phage (TLC ϕ) harbors four of these bases (Fig. 1D, blue bases of *dif_{GGI3}* and *attP_{TLC}*) (25). We previously demonstrated that XerD poorly bound to *attP_{TLC}*, which is sufficient to prevent XerD-mediated FtsK-dependent recombination (25). Thus, it is tempting to propose that GGI are IMEX and *dif_{GGI}* sites were selected not only to escape but also to overcome the normal cellular control imposed on Xer recombination by FtsK. GGI harboring *dif_{GGI3}* probably belong to the TLC ϕ class of

IMEX, which integrate into and excise from the genome of their host via a XerD-first FtsK-independent recombination pathway (25). GGI harboring *dif_{GGI1}* and *dif_{GGI2}* probably define a new class of IMEX. Future work will need to address the Xer recombination pathway they exploit and if they can truly integrate independently of FtsK. In addition, it will be interesting to determine which factors encoded in the genome of GGI IMEX and/or in the genome of their host help them overcome the cellular control that is normally imposed on Xer recombination, as observed for plasmids (18) and the CTX ϕ class of IMEX (26).

Acknowledgments

Research in the F.-X.B. laboratory is funded by the European Research Council under the European Community's Seventh Framework Programme (FP7/2007-2013 Grant Agreement 281590).

- Dillard JP, Seifert HS (2001) A variable genetic island specific for *Neisseria gonorrhoeae* is involved in providing DNA for natural transformation and is found more often in disseminated infection isolates. *Mol Microbiol* 41(1):263–277.
- Hamilton HL, Domínguez NM, Schwartz KJ, Hackett KT, Dillard JP (2005) *Neisseria gonorrhoeae* secretes chromosomal DNA via a novel type IV secretion system. *Mol Microbiol* 55(6):1704–1721.
- Snyder LAS, Jarvis SA, Saunders NJ (2005) Complete and variant forms of the 'gonococcal genetic island' in *Neisseria meningitidis*. *Microbiology* 151(Pt 12):4005–4013.
- Hamilton HL, Schwartz KJ, Dillard JP (2001) Insertion-duplication mutagenesis of *Neisseria*: Use in characterization of DNA transfer genes in the gonococcal genetic island. *J Bacteriol* 183(16):4718–4726.
- Domínguez NM, Hackett KT, Dillard JP (2011) XerCD-mediated site-specific recombination leads to loss of the 57-kilobase gonococcal genetic island. *J Bacteriol* 193(2):377–388.
- Midonet C, Barre F-X (2014) Xer site-specific recombination: Promoting vertical and horizontal transmission of genetic information. *Microbiol Spectrum* 2(6):MDNA3-0056-2014.
- Fournes F, et al. (2016) FtsK translocation permits discrimination between an endogenous and an imported Xer/*dif* recombination complex. *Proc Natl Acad Sci USA* 113(28):7882–7887.
- Aussel L, et al. (2002) FtsK is a DNA motor protein that activates chromosome dimer resolution by switching the catalytic state of the XerC and XerD recombinases. *Cell* 108(2):195–205.
- Saleh OA, Pérals C, Barre FX, Allemand JF (2004) Fast, DNA-sequence independent translocation by FtsK in a single-molecule experiment. *EMBO J* 23(12):2430–2439.

- 10 Lee JY, Finkelstein IJ, Arciszewska LK, Sherratt DJ, Greene EC (2014) Single-molecule imaging of FtsK translocation reveals mechanistic features of protein-protein collisions on DNA. *Mol Cell* 54(5):832–843.
- 11 May PFJ, Zawadzki P, Sherratt DJ, Kapanidis AN, Arciszewska LK (2015) Assembly, translocation, and activation of XerCD-*dif* recombination by FtsK translocase analyzed in real-time by FRET and two-color tethered fluorophore motion. *Proc Natl Acad Sci USA* 112(37):E5133–E5141.
- 12 Graham JE, Sivanathan V, Sherratt DJ, Arciszewska LK (2010) FtsK translocation on DNA stops at XerCD-*dif*. *Nucleic Acids Res* 38(1):72–81.
- 13 Zawadzki P, et al. (2013) Conformational transitions during FtsK translocase activation of individual XerCD-*dif* recombination complexes. *Proc Natl Acad Sci USA* 110(43):17302–17307.
- 14 Kennedy SP, Chevalier F, Barre FX (2008) Delayed activation of Xer recombination at *dif* by FtsK during septum assembly in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 68(4):1018–1028.
- 15 Steiner WW, Kuempel PL (1998) Cell division is required for resolution of dimer chromosomes at the *dif* locus of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 27(2):257–268.
- 16 Deghorain M, et al. (2011) A defined terminal region of the *E. coli* chromosome shows late segregation and high FtsK activity. *PLoS One* 6(7):e22164.
- 17 Barre FX, et al. (2000) FtsK functions in the processing of a Holliday junction intermediate during bacterial chromosome segregation. *Genes Dev* 14(23):2976–2988.
- 18 Colloms SD (2013) The topology of plasmid-monomerizing Xer site-specific recombination. *Biochem Soc Trans* 41(2):589–594.
- 19 Das B, Martínez E, Midonet C, Barre F-X (2013) Integrative mobile elements exploiting Xer recombination. *Trends Microbiol* 21(1):23–30.
- 20 Recchia GD, Aroyo M, Wolf D, Blakely G, Sherratt DJ (1999) FtsK-dependent and -independent pathways of Xer site-specific recombination. *EMBO J* 18(20):5724–5734.
- 21 Pérals K, Cornet F, Merlet Y, Delon I, Louam JM (2000) Functional polarization of the *Escherichia coli* chromosome terminus: The *dif* site acts in chromosome dimer resolution only when located between long stretches of opposite polarity. *Mol Microbiol* 36(1):33–43.
- 22 Capioux H, Lesterlin C, Pérals K, Louam JM, Cornet F (2002) A dual role for the FtsK protein in *Escherichia coli* chromosome segregation. *EMBO Rep* 3(6):532–536.
- 23 Das B, Bischerour J, Val M-E, Barre F-X (2010) Molecular keys of the tropism of integration of the cholera toxin phage. *Proc Natl Acad Sci USA* 107(9):4377–4382.
- 24 Das B, Bischerour J, Barre F-X (2011) VGJ ϕ integration and excision mechanisms contribute to the genetic diversity of *Vibrio cholerae* epidemic strains. *Proc Natl Acad Sci USA* 108(6):2516–2521.
- 25 Midonet C, Das B, Paly E, Barre F-X (2014) XerD-mediated FtsK-independent integration of TLC ϕ into the *Vibrio cholerae* genome. *Proc Natl Acad Sci USA* 111(47):16848–16853.
- 26 Bischerour J, Spangenberg C, Barre F-X (2012) Holliday junction affinity of the base excision repair factor Endo III contributes to cholera toxin phage integration. *EMBO J* 31(18):3757–3767.

5.4 Stratégies de stabilité des IMEXs

Les IMEXs sont donc des éléments mobiles intégratifs utilisant Xer, une machinerie bactérienne très conservée, pour catalyser leur intégration au chromosome. Cependant utiliser des recombinases constitutivement exprimées dans la cellule et dont la fonction première est normalement la recombinaison en intramoléculaire entre deux sites cibles pour résoudre des dimères de chromosomes, nécessite de développer des stratégies pour être stable une fois intégré.

- **L'intégration sous forme simple brin** : Cette stratégie utilisée par CTX permet de masquer le site de recombinaison après sa conversion en ADN double brins. Le prophage CTX s'en retrouve alors très stable, mais nécessite deux copies intégrées en tandem pour continuer de produire des particules phagiques par réplication en cercle roulant. L'excision est très limitée voir impossible.
- **Empêcher un échange productif catalysé par XerD** : Les IMEXs de type CTX ϕ et VGJ ϕ ont une région centrale au pied de XerD, empêchant la formation de HJ par cette voie. FtsK ne peut exciser ces éléments du chromosome même en activant XerD. Mais une telle stratégie signifie s'intégrer via un échange initié par XerC et finalisé par le passage de la fourche de réplication. L'IMEXs ne peut donc s'exciser que partiellement, dans l'une des deux cellules filles issue de la réplication. Les HJ résultant d'un échange de brins catalysé par XerC sont cependant très instables et fortement révertées. Utiliser un premier échange de brins par XerC nécessite donc un facteur permettant de stabiliser la HJ jusqu'au passage de la fourche de réplication.

- **Affecter la fixation de XerD** : Via cette stratégie, les IMEXs de type GGI (et TLC ?) sont stabilisés par la translocation de FtsK qui détruit le complexe de fixation d'un dimère de XerCD sur le site *attP* lorsque l'IMEXs est intégré au chromosome. Dans le cas de TLC un facteur accessoire : la protéine XafT, permet de détourner cette inhibition de l'excision. C'est alors le niveau de transcription et traduction du facteur de recombinaison qui semble déterminer la stabilité de l'IMEXs.

5.5 Interactions entre les différents IMEXs

Les IMEXs ciblent le même site : *dif*, et sont capables de s'intégrer en tandem en une ou plusieurs copies. Cette particularité conduit notamment à des interactions entre eux de manière directe ou indirecte.

Ces interactions peuvent jouer sur la réplication, le nombre de copies ou la formation de copies extrachromosomales. Comme nous l'avons vu, l'intégration de CTX est irréversible. La production de copies extrachromosomales et donc de particules phagiques nécessite l'intégration de deux copies en tandem de CTX [180]. La réplication en cercle roulant est initiée sur la première copie et s'achève sur la seconde [180]. Les formes extrachromosomales en résultant sont des hybrides des deux copies intégrées. Le phage RS1 de la même catégorie d'IMEXs que CTX, est un phage satellite de séquence similaire à une partie du génome de CTX appelée RS2 et contenant les modules d'intégration et de réplication. Ainsi la réplication en cercle roulant débutant sur un CTX peut se terminer sur un RS1 (ou inversement) et conduire à la formation de copies extrachromosomales hybrides. De plus, RS1 contient un gène supplémentaire nommé *rstC* et

qui code pour un anti-répresseur de la réplication et est donc capable de réguler le nombre de copies de CTX et RS1 [181].

Ces interactions peuvent également se faire au niveau de l'excision des IMEXs comme dans le cas de TLC ou VGJ. Il a été montré que l'excision de copies de VGJ intégrées avant CTX co-excise CTX et forme des particules phagiques hybrides CTX/VGJ capables d'être empaquetées par les protéines de capsides de VGJ [182, 144, 145]. Cet hybride permet d'étendre le spectre d'infection de CTX puisque CTX cible normalement le récepteur TCP (toxin co-regulated pilus) qui n'est exprimé qu'en conditions intestinales [183]. Or le récepteur cible de VGJ pour l'adsorption est MSHA (mannose-sensitive hemagglutinin), un récepteur constitutivement exprimé à la surface de *V. cholerae*.

TLC est le premier IMEXs intégré (en terme de position) dans la quasi-totalité des souches pandémiques de *V. cholerae*. Il a été proposé que TLC aide l'intégration de CTX même si le modèle actuel est peu convaincant [148, 147]. En effet en 2010, Hassan et al. [148] proposent que la plupart des souches environnementales de *V. cholerae* possèdent un site *difA* portant des mutations dans le bras de fixation de XerC. Ces mutations résulteraient en des souches défectueuses pour la résolution des dimères de chromosomes, un phénotype de filamentation et une incapacité pour CTX d'infecter ce site. L'intégration de TLC conduirait à la conversion du site *difA* en un site *dif1* fonctionnel pour l'intégration de CTX et la CDR. Néanmoins cette étude n'a pas été réalisée dans un contexte isogénique, et les auteurs n'ont pas vérifié que CTX c'est pas capable de s'intégrer dans un site *difA*, ni que les souches filamenteuses avant entrée de TLC étaient défectueuses pour la CDR à cause du site *difA*. Cependant, au cours de notre étude de l'intégration et excision de TLC nous avons démontré que l'excision de

TLC permettait la co-excision de CTX [30] et de tous les IMEXs intégré après lui, ce qui présente un point important aux vues de sa position par rapport à *dif* dans les souches toxigéniques.

5.6 Similitudes entre les IMEXs et les ICEs

Les ICEs (Integrative conjugative element) sont des éléments mobiles intégratifs capables de transposer d'une cellule donneuse vers une cellule receveuse. Dans leur revue sur les ICE de type SXT/R391, ICEBs1 et ICESt1/ICESt3, N. Carraro et V. Burrus [184] décrivent la biologie de certains ICEs et leurs interactions avec d'autres éléments mobiles. Il est intéressant de noter que ces éléments sont similaires aux IMEXs sur certains points. Tout d'abord contrairement aux transposons classiques, la plupart des ICEs s'intègrent en utilisant une recombinase à Tyrosine ou une recombinase à Sérine et seuls de rares cas utilisent une transposase de type DDE. Je ne traiterai ici que les ICEs de type SXT/R391 qui ciblent les *Enterobacteriaceae* et les *Vibrionaceae*. L'excision de ces éléments donne lieu à une forme ADN circulaire capable de réplication en cercle roulant dans certains cas.

Les ICEs de type SXT/R391 s'intègrent en utilisant l'intégrase Int_{SXT} et s'excisent avec cette même recombinase mais en présence d'un facteur d'excision supplémentaire "Xis". De manière intéressante, Xis est une protéine de liaison à l'ADN possédant un domaine HTH. L'expression de cette protéine est elle même régulée de manière complexe par trois autres gènes présent chez ces ICEs et eux même sous contrôle de la réponse SOS. Ces points pourraient nous faire penser à XafT dont on ne connaît pas encore la régulation et qui semble être limitant pour l'excision. Cependant plu-

sièurs différences apparaissent. Tout d'abord chez *E. coli* l'excision de SXT dans une population non induite s'effectue à une fréquence de 1% et n'est pas le facteur limitant pour le transfert de cet élément car la conjugation apparait à une fréquence 100 fois moins élevée. De plus Xis n'est pas utilisé pour l'intégration alors que XafT est également nécessaire à l'intégration de TLC.

SXT et R391 sont tous deux capables de s'intégrer dans le même site qui est la région promotrice du gène *prfC*. Lorsque c'est le cas ils s'intègrent alors en tandem ce qui rappelle l'intégration séquentielle des IMEXs. La recombinaison homologue entre ces deux copies donne lieu à un hybride SXT/R391 possédant de nouvelles propriétés. Des cas d'interactions avec d'autres éléments mobiles ont également été rapportés. Par exemple certains MGI (pour Mobilizable Genomic islands) ont été décrit comme piratant le système de conjugaison des ICE et leur excision dépendrait de facteurs encodés par le génome de ces derniers.

Chapitre 6

Perspectives

Comme nous l'avons vu dans l'introduction les modèles proposés pour la recombinaison Xer reposent fortement sur l'étude des recombinases Cre du phage P1. Cependant il est difficile d'intégrer complètement ces deux modèles ensembles car la recombinaison Xer implique un hétérotétramère et est sous le contrôle d'une tierce protéine du cycle cellulaire : FtsK. Plus particulièrement, selon le modèle Cre, les interactions cycliques entre XerC et XerD (la recombinase active donne son Cter en *cis*) doivent être détruites pour passer d'une synapse favorable à un premier échange XerC (par défaut car XerD n'est pas actif) à une synapse favorable à un premier échange médié par XerD. Mais les données récentes de molécule unique contredisent ce modèle et suggèrent que l'activation se fait sans devoir détruire et reformer la synapse puisque FtsK arrive et active la recombinaison au sein d'une synapse déjà formée [29, 87].

XafT pourrait permettre l'étude à une échelle atomique, des changements structuraux ayant lieu au cours de l'activation/inactivation de XerD et XerC au sein d'une synapse de recombinaison. En effet XafT présente deux avantages principaux pour cette étude : (i) Premièrement,

XafT est une protéine cytoplasmique de petite taille (environ 23KDa) qui semble capable de favoriser un complexe pro-XerD. Elle active XerD pour qu'il réalise le premier échange de brins, donnant lieu à une HJ résolue par XerC. Un double échange de brins peu avoir lieu comme dans la CDR. Sa petite taille facilitera les études structurales. (ii) L'action de XafT ne nécessite pas de séquence ADN accessoires ni d'autres protéines de l'hôte comme c'est le cas pour la résolution des dimères de plasmides [121, 125]. Les études *in vitro* utilisant FtsK nécessite l'ajout d'ADN contenant des séquences KOPS pour permettre le chargement et la translocation de FtsK jusqu'à la synapse. L'efficacité d'activation *in vitro* de XerD avec un domaine γ FtsK apporté en *trans* est faible par rapport à XafT. L'utilisation d'une fusion de γ XerD est quant à elle suspectée d'impacter le contrôle catalytique que XerC et XerD exercent l'une sur l'autre [44].

6.1 Caractériser XafT

XafT est une protéine dont la fonction était inconnue et nous possédons peu d'informations à son sujet. Afin de comprendre son mécanisme d'action il serait envisageable de définir les paramètres suivants : (i) Le domaine HTH en Nter suggère que la protéine pourrait dimériser. Cette hypothèse est également renforcée par des données préliminaires de double hybride et de RMN réalisées sur cette protéine et qui indiquent qu'elle serait multimérique (données non montrées et en partenariat avec le laboratoire du Dr. F. Ochsenbein). Des essais de gel filtration nous renseigneraient sur son ou ses différents états multimériques. Il serait possible d'isoler les différentes formes et déterminer quelle fraction active la recombinaison. (ii) L'aspect multimérique de la protéine semble empêcher l'obtention de la structure par RMN. Nous pourrions donc essayer d'obtenir la structure de XafT par

6.2. DÉFINIR LE SITE D'INTERACTION ENTRE XERD ET XAFT183

cristallographie. (iii) Des essais de mutagenèse aléatoire suivis d'un crible testant la recombinaison Xer sous l'influence de Xaft nous renseigneraient sur le site d'action de cette protéine.

Il est également possible de connaître les proportions stochiométriques de chaque protéines impliquées dans le complexe ainsi que leurs constantes de dissociation en ayant recours à l'ultracentrifugation analytique. Nous pourrions alors connaître l'affinité de XerD pour un substrat ADN en présence ou en absence de Xaft, mais aussi la forme multimérique de Xaft sur le complexe de recombinaison.

6.2 Définir le site d'interaction entre XerD et Xaft

Nous avons démontré que Xaft interagit directement avec XerD. Afin de comprendre le mécanisme d'activation de XerD par Xaft nous pourrions étudier dans un premier temps quels sont les résidus acides aminés impliqués dans cette interaction. Cette étude pourrait être réalisée en utilisant un crible génétique de type double hybride et testant une banque de mutants pour Xaft et XerD.

6.3 Comparer qualitativement la conformation de la synapse XerCD/*dif* lors d'une activation par FtsK ou Xaft

Il est probable que le mécanisme d'activation de XerD par Xaft soit différent de celui de FtsK et que la synapse de recombinaison soit légère-

ment différente. Pour vérifier ce point nous avons commencé une collaboration avec le laboratoire du Pr. D. J. Sherratt à Oxford afin de réaliser les mêmes analyses de molécule unique en temps réel, que celles réalisées avec FtsK, mais avec XaT [29]. Cette technique repose principalement sur l'utilisation du FRET (Förster Resonance Energy Transfer) bien que dans le cas de l'étude de l'activation par FtsK elle soit été couplée à deux autres techniques de biophysique : le PIFE (Protein Induced Fluorescence Enhancement) et le TFM (Tethered Fluorophore Motion). L'ADN linéaire double brins d'intérêt et couplé à une biotine est fixé à une surface recouverte de Neutravidine. Celui-ci contient deux sites *dif* en répétitions directes et séparés par environ 1kb d'ADN pour permettre la formation de la synapse (voir Figure 6.1). À proximité directe de chaque site *dif* se situe un fluorophore, Cy3B (le donneur) et Cy5 (l'accepteur). Cy3B et Cy5 ont été positionnés de manière à obtenir un transfert d'énergie de Cy3B vers Cy5 en cas de formation d'une synapse de recombinaison, ou de HJ.

L'efficacité de FRET obtenue permet de déduire la distance entre les deux fluorophores et donc indirectement celle entre les deux ADN marqués. Ainsi différentes efficacités de FRET sont obtenues pour des HJ faites par XerD, isomérisant pour permettre le clivage par XerC, ou les présynapses formées avant activation de XerD. Avec ce substrat, en cas de double échange de brins, le FRET fini par être perdu et le signal de fluorescence bouge énormément puisque l'ADN excisé de 1kb contenant les deux fluorophores diffuse dans le milieu.

En collaboration avec cette équipe, j'ai donc dans un premier temps vérifié que sur un substrat chargé des deux sites *dif*_{*E.coli*}, la synapse de pré-recombinaison formée par les XerC et XerD_{*V.ch.*} était comparable à celle

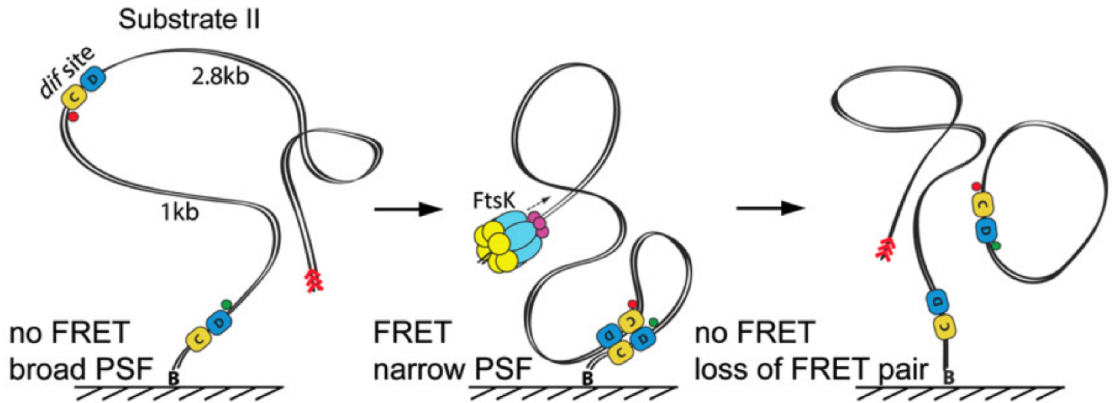


FIGURE 6.1 – Schéma représentant le substrat ADN et le principe du suivi de la formation d'une synapse de recombinaison Xer en temps réel. Les sites de fixation de XerC et XerD sont schématisés respectivement par des carrés jaunes et bleus. Les fluorophores Cy3B et Cy5 par des cercles verts et rouges respectivement. Les flèches rouges indiquent des séquences KOPS orientant la translocation de FtsK vers *dif*. Le fluorophore Cy5 est celui dont le mouvement est suivi pour le TFM. (PSF= Point Spread Function). Tiré de P. Zawadzki et al. [29].

des XerCD_{*E.coli*}. Dans le cas des synapses de pré-recombinaison formées par les XerCD de *E.coli* on obtient une efficacité de FRET $E^* \approx 0.72$ (voir Figure 6.2 graphe du milieu, ligne rouge).

Les premières données obtenues avec les XerC et XerD de *E.coli* corrélaient avec ce qui a été publié dans P. Zawadzki et al. [29]. Par la suite nous avons réalisé le même type d'expérience avec XerC et XerD de *V.cholerae*, toujours sur le site *dif*_{*E.coli*}. Nous avons obtenu le même type de profil avec une efficacité de FRET équivalente à celle avec les Xer de *E.coli* (voir Figure 6.3). Ces premiers résultats *in vitro* suggèrent donc que le complexe synaptique de pré-recombinaison doit être similaire malgré la "relaxation" des recombinases.

Enfin nous avons ajouté XafT en présence des XerC et XerD de *V.cholerae* sur un site *dif*_{*E.coli*}. Nous n'avons été capables d'obtenir qu'un

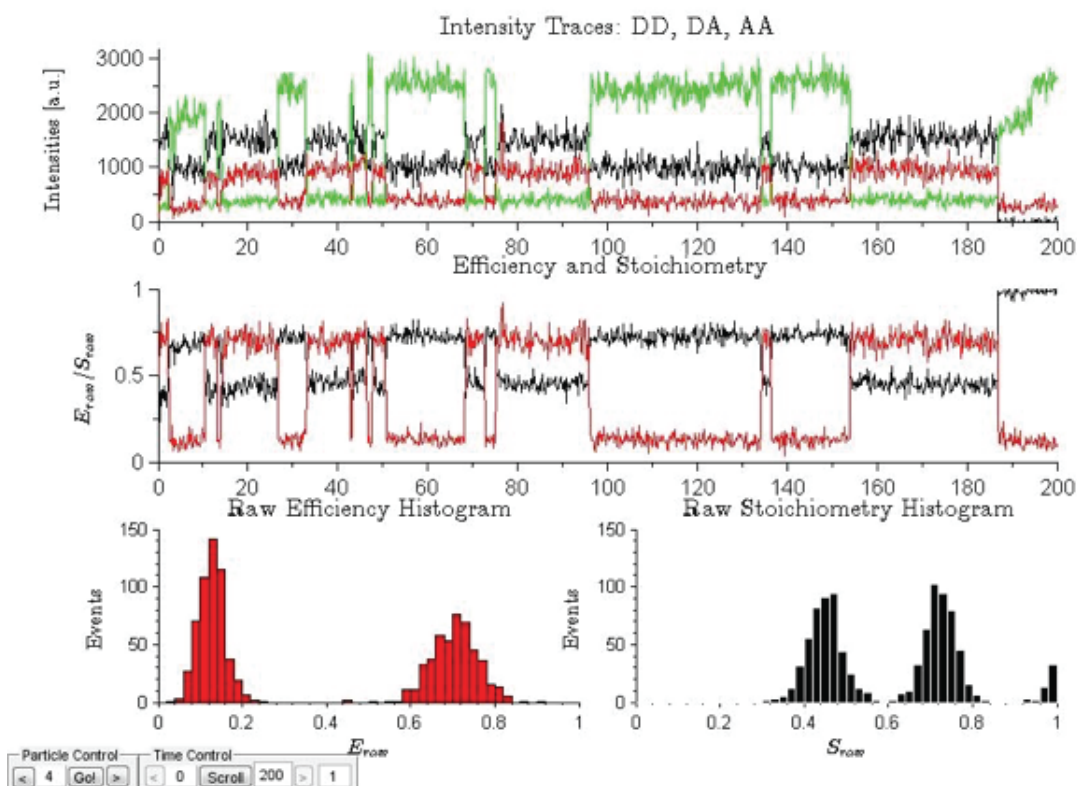
Substrate II *e.coli*XerCD

FIGURE 6.2 – Suivi en temps réel de l’efficacité de FRET de Cy3B vers Cy5 lors de la formation de synapse XerCD_{*E.coli*} sur deux sites *dif*_{*E.coli*}. Graphique du haut : en vert est l’intensité du donneur Cy3B. En rouge celle du receveur Cy5. La ligne noire représente l’intensité de l’accepteur Cy5 sous l’excitation du donneur Cy3B. DD : donneur/donneur, DA : donneur/accepteur, AA : accepteur/accepteur. L’axe des X correspond au temps d’enregistrement (en secondes). Graphique du milieu : E_{raw} = efficacité brute, S_{raw} = stoechiométrie brute en rouge et en noir respectivement. Les histogrammes du bas montrent la distributivité des différents évènements enregistrés.

seul évènement qui pourrait correspondre à la formation d’une HJ. Celui-ci est caractérisé par un passage très transitoire d’une efficacité de FRET de $E^* \approx 0.72$ à $E^* \approx 0.44$ et correspond à la valeur obtenue pour les HJ faites par XerD dans le cas de cette expérience avec ce substrat (voir Figure 6.4).

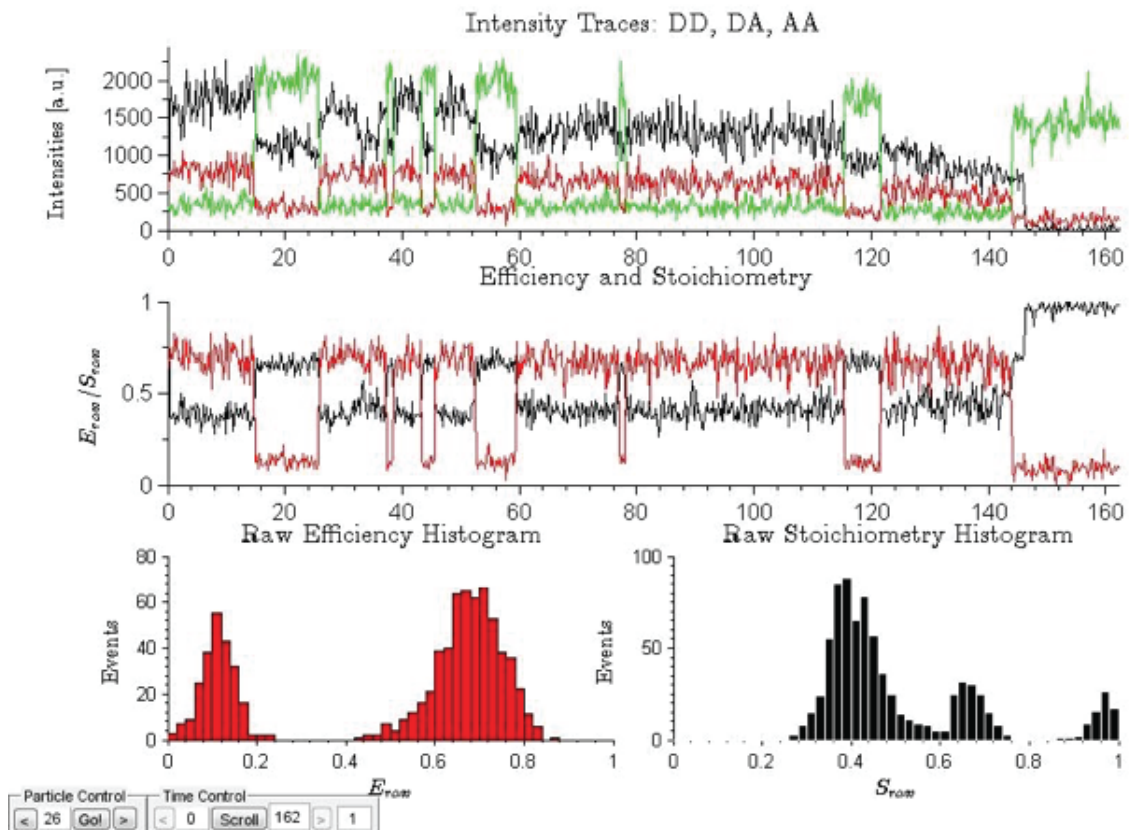
Substrate II *vib*XerCD

FIGURE 6.3 – Suivi en temps réel de l'efficacité de FRET de Cy3B vers Cy5 lors de la formation de synapse *vib*XerCD sur deux sites *difE.coli*. Même légende que Figure 6.2.

Une fois la HJ formée celle-ci semble stable.

XafT and *vibXerCD* : HJ formation ?

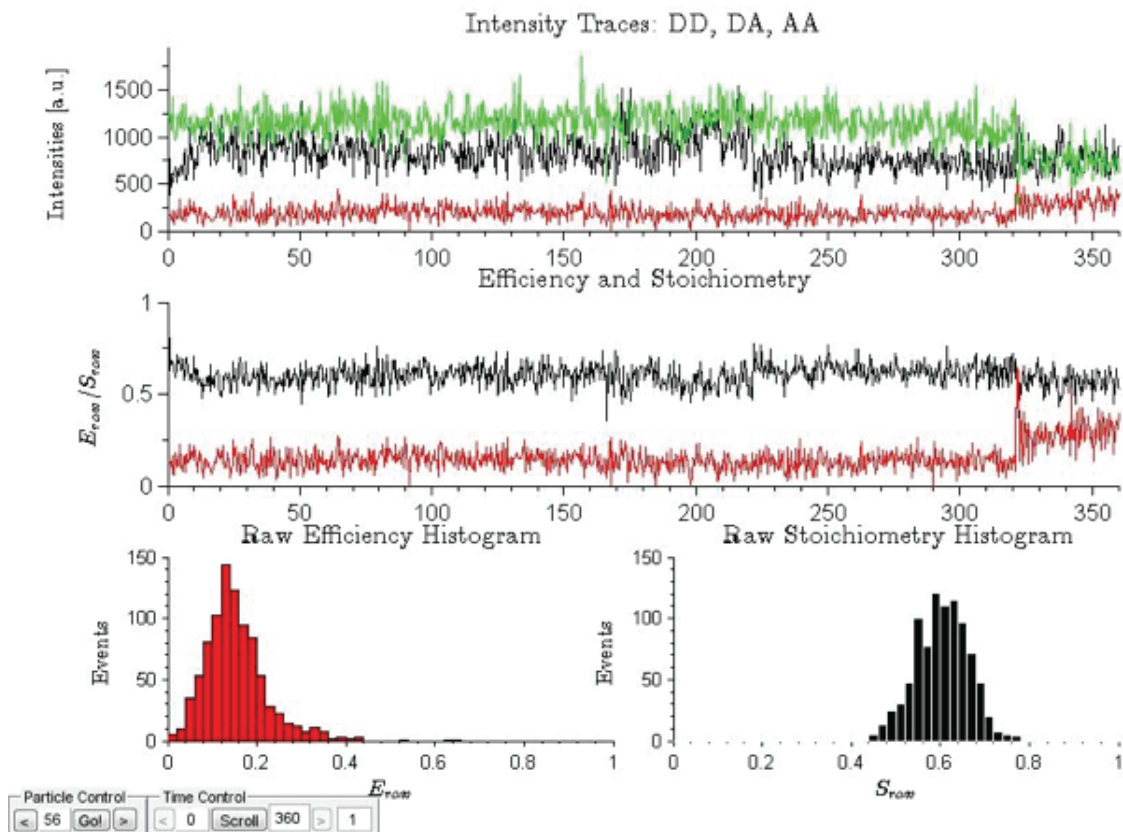


FIGURE 6.4 – Suivi en temps réel de l'efficacité de FRET de Cy3B vers Cy5 lors de l'activation d'une synapse *vibXerCD* sur deux sites $dif_{E.coli}$ et sous l'influence de XafT. Même légende que Figure 6.2

Cependant ces données ne sont que des données préliminaires. Il est possible que la raison pour laquelle de tels événements soient rares est que nous avons utilisé des sites $dif_{E.coli}$. Or nous avons démontré que XafT active moins efficacement la recombinaison Xer sur ces sites. Nous construisons donc actuellement des substrats contenant deux sites $dif1$. Nous espérons pouvoir collecter suffisamment de données par la suite afin de comparer les

complexes d'activation sous FtsK et XafT.

Bibliographie

- [1] F. Jacob and E. Wollman. Sexuality and the Genetics of Bacteria. Academic Press, New York, 1961.
- [2] Elizabeth S. Egan, Michael A. Fogel, and Matthew K. Waldor. MicroReview : Divided genomes : negotiating the cell cycle in prokaryotes with multiple chromosomes. *56(5)* :1129–1138.
- [3] George Chaconas and Kerri Kobryn. Structure, function, and evolution of linear replicons in *Borrelia*. *Annu. Rev. Microbiol.*, 64 :185–202, 2010.
- [4] J R Lobry. Asymmetric substitution patterns in the two DNA strands of bacteria. *Mol. Biol. Evol.*, 13(5) :660–665, May 1996.
- [5] M. J. McLean, K. H. Wolfe, and K. M. Devine. Base composition skews, replication orientation, and gene orientation in 12 prokaryote genomes. *J Mol Evol*, 47(6) :691–6, 1998.
- [6] D E Adams, E M Shekhtman, E L Zechiedrich, M B Schmid, and N R Cozzarelli. The role of topoisomerase IV in partitioning bacterial replicons and the structure of catenated intermediates in DNA replication. *Cell*, 71(2) :277–288, October 1992.
- [7] Caroline Midonet and Francois-Xavier Barre. Xer Site-Specific Recombination : Promoting Vertical and Horizontal Transmission of Genetic Information. *microbiolspec*, 2(6), 2014.
- [8] F X Barre, B Søballe, B Michel, M Aroyo, M Robertson, and D Sherratt. Circles : the replication-recombination-chromosome segregation connection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 98(15) :8189–8195, July 2001.
- [9] C. Carnoy and C. A. Roten. The dif/Xer recombination systems in proteobacteria. *PLoS One*, 4(9) :e6531, 2009.
- [10] H. Hendrickson and J. G. Lawrence. Mutational bias suggests that replication termination occurs near the dif site, not at Ter sites. *Mol Microbiol*, 64(1) :42–56, 2007.
- [11] N. Kono, K. Arakawa, and M. Tomita. Comprehensive prediction of chromosome dimer resolution sites in bacterial genomes. *BMC Genomics*, 12(1) :19, 2011.
- [12] P. L. Kuempel, J. M. Henson, L. Dircks, M. Tecklenburg, and D. F. Lim. dif, a recA-independent recombination site in the terminus region of the chromosome of *Escherichia coli*. *New Biol.*, 3(8) :799–811, 1991.

- [13] G Blakely, S Colloms, G May, M Burke, and D Sherratt. Escherichia coli XerC recombinase is required for chromosomal segregation at cell division. *New Biol.*, 3(8) :789–798, August 1991.
- [14] G Blakely, G May, R McCulloch, L K Arciszewska, M Burke, S T Lovett, and D J Sherratt. Two related recombinases are required for site-specific recombination at dif and cer in E. coli K12. *Cell*, 75(2) :351–361, October 1993.
- [15] M. Clerget. Site-specific recombination promoted by a short DNA segment of plasmid R1 and by a homologous segment in the terminus region of the Escherichia coli chromosome. *New Biol.*, 3(8) :780–8, 1991.
- [16] A. Hojgaard, H. Szerlong, C. Tabor, and P. Kuempel. Norfloxacin-induced DNA cleavage occurs at the dif resolvase locus in Escherichia coli and is the result of interaction with topoisomerase IV. *Mol. Microbiol.*, 33(5) :1027–36, 1999.
- [17] Olivier Espeli, Chong Lee, and Kenneth J Mariani. A physical and functional interaction between Escherichia coli FtsK and topoisomerase IV. *J. Biol. Chem.*, 278(45) :44639–44644, November 2003.
- [18] D. K. Summers and D. J. Sherratt. Multimerization of high copy number plasmids causes instability : CoIE1 encodes a determinant essential for plasmid monomerization and stability. *Cell*, 36(4) :1097–103, 1984.
- [19] S. D. Colloms, P. Sykora, G. Szatmari, and D. J. Sherratt. Recombination at CoIE1 cer requires the Escherichia coli xerC gene product, a member of the lambda integrase family of site-specific recombinases. *J. Bacteriol.*, 172(12) :6973–80, 1990.
- [20] P. Le Bourgeois, M. Bugarel, N. Campo, M. L. Daveran-Mingot, J. Labonte, D. Lanfranchi, T. Lautier, C. Pages, and P. Ritzenthaler. The Unconventional Xer Recombination Machinery of Streptococci/Lactococci. *PLoS Genet*, 3(7) :e117, 2007.
- [21] Diego Cortez, Sophie Quevillon-Cheruel, Simonetta Gribaldo, Nicole Desnoues, Guennadi Sezonov, Patrick Forterre, and Marie-Claude Serre. Evidence for a Xer/dif system for chromosome resolution in archaea. *PLoS Genet.*, 6(10) :e1001166, October 2010.
- [22] Iain G. Duggin, Nelly Dubarry, and Stephen D. Bell. Replication termination and chromosome dimer resolution in the archaeon Sulfolobus solfataricus. *EMBO J*, 30(1) :145–153, January 2011.
- [23] H. S. Subramanya, L. K. Arciszewska, R. A. Baker, L. E. Bird, D. J. Sherratt, and D. B. Wigley. Crystal structure of the site-specific recombinase, XerD. *EMBO J.*, 16(17) :5178–87, 1997.
- [24] Y. Cao, B. Hallet, D. J. Sherratt, and F. Hayes. Structure-function correlations in the XerD site-specific recombinase revealed by pentapeptide scanning mutagenesis. *J. Mol. Biol.*, 274(1) :39–53, 1997.

- [25] Paul A Rowley, Hsui-Fang Fan, Piotr Guga, Makkuni Jayaram, Yuri Voznyanov, Aashiq H Kachroo, and Chien-Hui Ma. An overview of tyrosine site-specific recombination : From an *flp* perspective. In Alan M. Lambowitz, Martin Gellert, Michael Chandler, Nancy L. Craig, Suzanne B. Sandmeyer, and Phoebe A. Rice, editors, *Mobile DNA III*, pages 43–71. American Society of Microbiology.
- [26] P Klemm. Two regulatory *fim* genes, *fimB* and *fimE*, control the phase variation of type 1 fimbriae in *Escherichia coli*. *EMBO J.*, 5(6) :1389–1393, June 1986.
- [27] Arthur Landy. The λ Integrase Site-specific Recombination Pathway. *Microbiol Spectr*, 3(2) :MDNA3–0051–2014, April 2015.
- [28] B. Gibb, K. Gupta, K. Ghosh, R. Sharp, J. Chen, and G. D. Van Duyne. Requirements for catalysis in the *cre* recombinase active site. 38(17) :5817–5832.
- [29] Pawel Zawadzki, Peter F J May, Rachel A Baker, Justin N M Pinkney, Achillefs N Kapanidis, David J Sherratt, and Lidia K Arciszewska. Conformational transitions during FtsK translocase activation of individual XerCD-dif recombination complexes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 110(43) :17302–17307, October 2013.
- [30] Caroline Midonet, Bhabatosh Das, Evelyne Paly, and Francois-Xavier Barre. XerD-mediated FtsK-independent integration of $TLC\phi$ into the *Vibrio cholerae* genome. *PNAS*, 111(47) :16848–53, November 2014.
- [31] Marie-Eve Val, Sean P. Kennedy, Meriem El Karoui, Laetitia Bonne, Fabien Chevalier, and Francois-Xavier Barre. FtsK-dependent dimer resolution on multiple chromosomes in the pathogen *Vibrio cholerae*. *PLoS Genet*, 4(9), 2008.
- [32] G. W. Blakely, A. O. Davidson, and D. J. Sherratt. Binding and cleavage of nicked substrates by site-specific recombinases XerC and XerD. *J. Mol. Biol.*, 265(1) :30–9, 1997.
- [33] S. D. Colloms, R. McCulloch, K. Grant, L. Neilson, and D. J. Sherratt. Xer-mediated site-specific recombination in vitro. 15(5) :1172–1181.
- [34] R McCulloch, L W Coggins, S D Colloms, and D J Sherratt. Xer-mediated site-specific recombination at *cer* generates Holliday junctions in vivo. *EMBO J.*, 13(8) :1844–1855, April 1994.
- [35] F. Cornet, B. Hallet, and D. J. Sherratt. Xer recombination in *Escherichia coli*. Site-specific DNA topoisomerase activity of the XerC and XerD recombinases. *J. Biol. Chem.*, 272(35) :21927–31, 1997.
- [36] F. Guo, D. N. Gopaul, and G. D. van Duyne. Structure of Cre recombinase complexed with DNA in a site-specific recombination synapse. *Nature*, 389(6646) :40–6, 1997.
- [37] B. M. Swalla, R. I. Gumport, and J. F. Gardner. Conservation of structure and function among tyrosine recombinases : homology-based modeling of

- the lambda integrase core-binding domain. *Nucleic Acids Res*, 31(3) :805–18, 2003.
- [38] G. W. Blakely and D. J. Sherratt. Interactions of the site-specific recombinases XerC and XerD with the recombination site dif. *Nucleic Acids Res.*, 22(25) :5613–20, 1994.
- [39] A. J. Spiers and D. J. Sherratt. Relating primary structure to function in the Escherichia coli XerD site-specific recombinase. *Mol. Microbiol.*, 24(5) :1071–82, 1997.
- [40] A. J. Spiers and D. J. Sherratt. C-terminal interactions between the XerC and XerD site-specific recombinases. *Mol. Microbiol.*, 32(5) :1031–42, 1999.
- [41] I. Grainge, D. Buck, and M. Jayaram. Geometry of site alignment during int family recombination : antiparallel synapsis by the flp recombinase. 298(5) :749–764.
- [42] Sarah C Gourlay and Sean D Colloms. Control of Cre recombination by regulatory elements from Xer recombination systems. *Mol. Microbiol.*, 52(1) :53–65, April 2004.
- [43] B. Hallet, D. J. Sherratt, and F. Hayes. Pentapeptide scanning mutagenesis : random insertion of a variable five amino acid cassette in a target protein. *Nucleic Acids Res.*, 25(9) :1866–7, 1997.
- [44] B Hallet, L K Arciszewska, and D J Sherratt. Reciprocal control of catalysis by the tyrosine recombinases XerC and XerD : an enzymatic switch in site-specific recombination. *Mol. Cell*, 4(6) :949–959, December 1999.
- [45] Julie F. Senecoff. Directionality in flp protein-promoted site-specific recombination is mediated by dna-dna pairing. *The Journal of Biological Chemistry*, 261(16) :7380–7386, juin 1986.
- [46] Nigel D. F. Grindley, Katrine L. Whiteson, and Phoebe A. Rice. Mechanisms of site-specific recombination. 75 :567–605.
- [47] D. N. Gopaul, F. Guo, and G. D. Van Duyne. Structure of the Holliday junction intermediate in Cre-loxP site-specific recombination. *EMBO J.*, 17(14) :4175–87, 1998.
- [48] L. Arciszewska, I. Grainge, and D. Sherratt. Effects of Holliday junction position on Xer-mediated recombination in vitro. *EMBO J*, 14(11) :2651–60, 1995.
- [49] S. E. Nunes-Düby, L. Matsumoto, and A. Landy. Site-specific recombination intermediates trapped with suicide substrates. 50(5) :779–788.
- [50] J. Lee and M. Jayaram. Role of partner homology in DNA recombination. Complementary base pairing orients the 5'-hydroxyl for strand joining during Flp site-specific recombination. *J Biol Chem*, 270(8) :4042–52, 1995.
- [51] S. E. Nunes-Duby, M. A. Azaro, and A. Landy. Swapping DNA strands and sensing homology without branch migration in lambda site-specific recombination. *Curr Biol*, 5(2) :139–48, 1995.

- [52] K. Ghosh, C. K. Lau, F. Guo, A. M. Segall, and G. D. Van Duyne. Peptide trapping of the Holliday junction intermediate in Cre-loxP site-specific recombination. *J Biol Chem*, 280(9) :8290–9, 2005.
- [53] M. Klemm, C. Cheng, G. Cassell, S. Shuman, and A. M. Segall. Peptide inhibitors of DNA cleavage by tyrosine recombinases and topoisomerases. *J Mol Biol*, 299(5) :1203–16, 2000.
- [54] J. L. Boldt, C. Pinilla, and A. M. Segall. Reversible inhibitors of lambda integrase-mediated recombination efficiently trap Holliday junction intermediates and form the basis of a novel assay for junction resolution. *J Biol Chem*, 279(5) :3472–83, 2004.
- [55] G. D. Cassell and A. M. Segall. Mechanism of inhibition of site-specific recombination by the Holliday junction-trapping peptide WKHYNY : insights into phage lambda integrase-mediated strand exchange. *J Mol Biol*, 327(2) :413–29, 2003.
- [56] C. W. Gunderson and A. M. Segall. DNA repair, a novel antibacterial target : Holliday junction-trapping peptides induce DNA damage and chromosome segregation defects. *Mol Microbiol*, 59(4) :1129–48, 2006.
- [57] S. P. Kennedy, F. Chevalier, and F. X. Barre. Delayed activation of Xer recombination at dif by FtsK during septum assembly in Escherichia coli. *Mol Microbiol*, 68(4) :1018–28, 2008.
- [58] W. W. Steiner and P. L. Kuempel. Cell division is required for resolution of dimer chromosomes at the dif locus of Escherichia coli. *Mol. Microbiol.*, 27(2) :257–68, 1998.
- [59] Gaëlle Demarre, Elisa Galli, Leila Muresan, Evelyne Paly, Ariane David, Christophe Possoz, and François-Xavier Barre. Differential Management of the Replication Terminus Regions of the Two Vibrio cholerae Chromosomes during Cell Division. *PLoS Genet.*, 10(9) :e1004557, September 2014.
- [60] K Péral, H Capioux, J B Vincourt, J M Louarn, D J Sherratt, and F Cornet. Interplay between recombination, cell division and chromosome structure during chromosome dimer resolution in Escherichia coli. *Mol. Microbiol.*, 39(4) :904–913, February 2001.
- [61] K. Péral, F. Cornet, Y. Merlet, I. Delon, and J. M. Louarn. Functional polarization of the escherichia coli chromosome terminus : the dif site acts in chromosome dimer resolution only when located between long stretches of opposite polarity. *36(1)* :33–43, 2000.
- [62] F X Barre, M Aroyo, S D Colloms, A Helfrich, F Cornet, and D J Sherratt. FtsK functions in the processing of a Holliday junction intermediate during bacterial chromosome segregation. *Genes Dev.*, 14(23) :2976–2988, December 2000.
- [63] Christine Kaimer, Katrin Schenk, and Peter L Graumann. Two DNA translocases synergistically affect chromosome dimer resolution in Bacillus subtilis. *J. Bacteriol.*, 193(6) :1334–1340, March 2011.

- [64] S. Bigot, O. A. Saleh, C. Lesterlin, C. Pages, M. El Karoui, C. Dennis, M. Grigoriev, J. F. Allemand, F. X. Barre, and F. Cornet. KOPS : DNA motifs that control *E. coli* chromosome segregation by orienting the FtsK translocase. *EMBO J.*, 24(21) :3770–80, 2005.
- [65] V. Sivanathan, M. D. Allen, C. de Bekker, R. Baker, L. K. Arciszewska, S. M. Freund, M. Bycroft, J. Lowe, and D. J. Sherratt. The FtsK gamma domain directs oriented DNA translocation by interacting with KOPS. *Nat Struct Mol Biol*, 13(11) :965–972, 2006.
- [66] S. Bigot, O. A. Saleh, F. Cornet, J. F. Allemand, and F. X. Barre. Oriented loading of FtsK on KOPS. *Nat Struct Mol Biol*, 13(11) :1026–8, 2006.
- [67] V. Sivanathan, J. E. Emerson, C. Pages, F. Cornet, D. J. Sherratt, and L. K. Arciszewska. KOPS-guided DNA translocation by FtsK safeguards *Escherichia coli* chromosome segregation. *Mol Microbiol*, 71(4) :1031–42, 2009.
- [68] J. Lowe, A. Ellonen, M. D. Allen, C. Atkinson, D. J. Sherratt, and I. Grainge. Molecular mechanism of sequence-directed DNA loading and translocation by FtsK. *Mol Cell*, 31(4) :498–509, 2008.
- [69] K. J. Begg, S. J. Dewar, and W. D. Donachie. A new *Escherichia coli* cell division gene, *ftsK*. *J. Bacteriol.*, 177(21) :6211–22, 1995.
- [70] X. C. Yu, A. H. Tran, Q. Sun, and W. Margolin. Localization of cell division protein FtsK to the *Escherichia coli* septum and identification of a potential N-terminal targeting domain. *J. Bacteriol.*, 180(5) :1296–304, 1998.
- [71] G. C. Draper, N. McLennan, K. Begg, M. Masters, and W. D. Donachie. Only the N-terminal domain of FtsK functions in cell division. *J. Bacteriol.*, 180(17) :4621–7, 1998.
- [72] S. Bigot, V. Sivanathan, C. Possoz, F. X. Barre, and F. Cornet. FtsK, a literate chromosome segregation machine. *Mol Microbiol*, 64(6) :1434–41, 2007.
- [73] A. A. Diez, A. Farewell, U. Nannmark, and T. Nystrom. A mutation in the *ftsK* gene of *Escherichia coli* affects cell-cell separation, stationary-phase survival, stress adaptation, and expression of the gene encoding the stress protein UspA. *J. Bacteriol.*, 179(18) :5878–83, 1997.
- [74] R. Dorazi and S. J. Dewar. Membrane topology of the N-terminus of the *Escherichia coli* FtsK division protein. *FEBS Lett*, 478(1-2) :13–8, 2000.
- [75] L. Wang and J. Lutkenhaus. FtsK is an essential cell division protein that is localized to the septum and induced as part of the SOS response. *Mol. Microbiol.*, 29(3) :731–40, 1998.
- [76] N. Dubarry and F. X. Barre. Fully efficient chromosome dimer resolution in *Escherichia coli* cells lacking the integral membrane domain of FtsK. *EMBO J*, 29(3) :597–605, 2010.

- [77] Gaelle Demarre, Elisa Galli, and Francois-Xavier Barre. The FtsK Family of DNA Pumps. *Adv Exp Med Biol*, 767 :245–262, 2013.
- [78] W. Steiner, G. Liu, W. D. Donachie, and P. Kuempel. The cytoplasmic domain of FtsK protein is required for resolution of chromosome dimers. *Mol. Microbiol.*, 31(2) :579–83, 1999.
- [79] L. J. Wu, P. J. Lewis, R. Allmansberger, P. M. Hauser, and J. Errington. A conjugation-like mechanism for prespore chromosome partitioning during sporulation in *Bacillus subtilis*. *Genes Dev.*, 9(11) :1316–26, 1995.
- [80] L. J. Wu and J. Errington. Coordination of cell division and chromosome segregation by a nucleoid occlusion protein in *Bacillus subtilis*. *Cell*, 117(7) :915–25, 2004.
- [81] S. J. Biller and W. F. Burkholder. The *Bacillus subtilis* SftA (YtpS) and SpoIIIE DNA translocases play distinct roles in growing cells to ensure faithful chromosome partitioning. *Mol Microbiol*, 74(4) :790–809, 2009.
- [82] J. Yates, I. Zhekov, R. Baker, B. Eklund, D. J. Sherratt, and L. K. Arciszewska. Dissection of a functional interaction between the DNA translocase, FtsK, and the XerD recombinase. *Mol Microbiol*, 59(6) :1754–66, 2006.
- [83] M. R. Singleton, M. S. Dillingham, and D. B. Wigley. Structure and mechanism of helicases and nucleic acid translocases. *Annu Rev Biochem*, 76 :23–50, 2007.
- [84] T. H. Massey, C. P. Mercogliano, J. Yates, D. J. Sherratt, and J. Lowe. Double-stranded DNA translocation : structure and mechanism of hexameric FtsK. *Mol. Cell*, 23 :457–469, 2006.
- [85] Paola Bisicchia, Bradley Steel, Mekdes H Mariam Debela, Jan Löwe, and David Sherratt. The N-terminal membrane-spanning domain of the *Escherichia coli* DNA translocase FtsK hexamerizes at midcell. *MBio*, 4(6) :e00800–00813, 2013.
- [86] Estelle Crozat and Ian Grainge. FtsK DNA translocase : the fast motor that knows where it’s going. *ChemBiochem*, 11(16) :2232–2243, November 2010.
- [87] Peter F. J. May, Pawel Zawadzki, David J. Sherratt, Achillefs N. Kapanidis, and Lidia K. Arciszewska. Assembly, translocation, and activation of XerCD-dif recombination by FtsK translocase analyzed in real-time by FRET and two-color tethered fluorophore motion. *PNAS*, 112(37) :E5133–E5141, September 2015.
- [88] S. Bigot, J. Corre, J. Louarn, F. Cornet, and F. X. Barre. FtsK activities in Xer recombination, DNA mobilization and cell division involve overlapping and separate domains of the protein. *Mol Microbiol*, 54(4) :876–86, 2004.
- [89] E. Crozat, A. Meglio, J. F. Allemand, C. E. Chivers, M. Howarth, C. Venien-Bryan, I. Grainge, and D. J. Sherratt. Separating speed and ability to displace roadblocks during DNA translocation by FtsK. *EMBO J*, 29(8) :1423–33, 2010.

- [90] Ninning Liu, Gheorghe Chistol, and Carlos Bustamante. Two-subunit DNA escort mechanism and inactive subunit bypass in an ultra-fast ring ATPase. *Elife*, 4, 2015.
- [91] P. J. Pease, O. Levy, G. J. Cost, J. Gore, J. L. Ptacin, D. Sherratt, C. Bustamante, and N. R. Cozzarelli. Sequence-directed DNA translocation by purified FtsK. *Science*, 307(5709) :586–90, 2005.
- [92] O. Levy, J. L. Ptacin, P. J. Pease, J. Gore, M. B. Eisen, C. Bustamante, and N. R. Cozzarelli. Identification of oligonucleotide sequences that direct the movement of the Escherichia coli FtsK translocase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(49) :17618–23, 2005.
- [93] Martin Thanbichler. Synchronization of chromosome dynamics and cell division in bacteria. 2(1) :a000331.
- [94] L. Aussel, F. X. Barre, M. Aroyo, A. Stasiak, A. Z. Stasiak, and D. Sherratt. FtsK is a DNA motor protein that activates chromosome dimer resolution by switching the catalytic state of the XerC and XerD recombinases. *Cell*, 108(2) :195–205, 2002.
- [95] L. K. Arciszewska and D. J. Sherratt. Xer site-specific recombination in vitro. *EMBO J.*, 14(9) :2112–20, 1995.
- [96] L. K. Arciszewska, I. Grainge, and D. J. Sherratt. Action of site-specific recombinases XerC and XerD on tethered Holliday junctions. *EMBO J.*, 16(12) :3731–43, 1997.
- [97] J. Yates, M. Aroyo, D. J. Sherratt, and F. X. Barre. Species specificity in the activation of Xer recombination at dif by FtsK. *Mol Microbiol*, 49(1) :241–9, 2003.
- [98] Andrew N. Keller, Yue Xin, Stephanie Boer, Jonathan Reinhardt, Rachel Baker, Lidia K. Arciszewska, Peter J. Lewis, David J. Sherratt, Jan Löwe, and Ian Grainge. Activation of Xer-recombination at dif : structural basis of the FtsK γ -XerD interaction. *Scientific Reports*, 6 :33357, October 2016.
- [99] I. Grainge, C. Lesterlin, and D. J. Sherratt. Activation of XerCD-dif recombination by the FtsK DNA translocase. *Nucleic Acids Res*, 39(12) :5140–8, 2011.
- [100] Cheikh Tidiane Diagne, Maya Salhi, Estelle Crozat, Laurence Salomé, Francois Cornet, Philippe Rousseau, and Catherine Tardin. TPM analyses reveal that FtsK contributes both to the assembly and the activation of the XerCD-dif recombination synapse. *Nucleic Acids Res.*, 42(3) :1721–1732, February 2014.
- [101] B. J. Peter, C. Ullsperger, H. Hiasa, K. J. Marians, and N. R. Cozzarelli. The structure of supercoiled intermediates in DNA replication. 94(6) :819–827.
- [102] J. J. Champoux. DNA topoisomerases : structure, function, and mechanism. 70 :369–413.

- [103] E. L. Zechiedrich, A. B. Khodursky, and N. R. Cozzarelli. Topoisomerase IV, not gyrase, decatenates products of site-specific recombination in *Escherichia coli*. *Genes Dev.*, 11(19) :2580–92, 1997.
- [104] C. Ullsperger and N. R. Cozzarelli. Contrasting enzymatic activities of topoisomerase IV and DNA gyrase from *Escherichia coli*. 271(49) :31549–31555.
- [105] Olivier Espeli, Cindy Levine, Heide Hassing, and Kenneth J Marians. Temporal regulation of topoisomerase IV activity in *E. coli*. *Mol. Cell*, 11(1) :189–201, January 2003.
- [106] D. J. Sherratt and D. B. Wigley. Conserved themes but novel activities in recombinases and topoisomerases. *Cell*, 93(2) :149–52, 1998.
- [107] C. Cheng, P. Kussie, N. Pavletich, and S. Shuman. Conservation of structure and mechanism between eukaryotic topoisomerase I and site-specific recombinases. 92(6) :841–850.
- [108] Stephen C. Y. Ip, Migena Bregu, François-Xavier Barre, and David J. Sherratt. Decatenation of DNA circles by FtsK-dependent Xer site-specific recombination. 22(23) :6399–6407.
- [109] I. Grainge, M. Bregu, M. Vazquez, V. Sivanathan, S. C. Ip, and D. J. Sherratt. Unlinking chromosome catenanes in vivo by site-specific recombination. *Embo J*, 26(19) :4228–4238, 2007.
- [110] N. J. Crisona, R. L. Weinberg, B. J. Peter, D. W. Summers, and N. R. Cozzarelli. The topological mechanism of phage lambda integrase. 289(4) :747–775.
- [111] N. J. Crisona, T. R. Strick, D. Bensimon, V. Croquette, and N. R. Cozzarelli. Preferential relaxation of positively supercoiled DNA by *E. coli* topoisomerase IV in single-molecule and ensemble measurements. *Genes Dev*, 14(22) :2881–92, 2000.
- [112] S Austin, M Ziese, and N Sternberg. A novel role for site-specific recombination in maintenance of bacterial replicons. *Cell*, 25(3) :729–736, September 1981.
- [113] Lydia Warth, Iris Haug, and Josef Altenbuchner. Characterization of the tyrosine recombinase MrpA encoded by the *Streptomyces coelicolor* a3(2) plasmid SCP2*. 193(3) :187–200.
- [114] F. Cornet, I. Mortier, J. Patte, and J. M. Louarn. Plasmid pSC101 harbors a recombination site, psi, which is able to resolve plasmid multimers and to substitute for the analogous chromosomal *Escherichia coli* site dif. *J. Bacteriol.*, 176(11) :3188–95, 1994.
- [115] S. D. Colloms, C. Alen, and D. J. Sherratt. The ArcA/ArcB two-component regulatory system of *Escherichia coli* is essential for Xer site-specific recombination at psi. *Mol. Microbiol.*, 28(3) :521–30, 1998.
- [116] D. J. Sherratt, L. K. Arciszewska, G. Blakely, S. Colloms, K. Grant, N. Leslie, and R. McCulloch. Site-specific recombination and circular chromo-

- some segregation. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 347(1319) :37–42, 1995.
- [117] C. J. Stirling, S. D. Colloms, J. F. Collins, G. Szatmari, and D. J. Sherratt. *xerB*, an *Escherichia coli* gene required for plasmid ColE1 site-specific recombination, is identical to *pepA*, encoding aminopeptidase A, a protein with substantial similarity to bovine lens leucine aminopeptidase. *EMBO J.*, 8(5) :1623–7, 1989.
- [118] C. J. Stirling, G. Szatmari, G. Stewart, M. C. Smith, and D. J. Sherratt. The arginine repressor is essential for plasmid-stabilizing site-specific recombination at the ColE1 *cer* locus. *EMBO J.*, 7(13) :4389–95, 1988.
- [119] W. K. Maas. The arginine repressor of *Escherichia coli*. 58(4) :631–640.
- [120] Sean D Colloms. The topology of plasmid-monomerizing Xer site-specific recombination. *Biochem. Soc. Trans.*, 41(2) :589–594, April 2013.
- [121] S D Colloms, J Bath, and D J Sherratt. Topological selectivity in Xer site-specific recombination. *Cell*, 88(6) :855–864, March 1997.
- [122] Mariel Vazquez, Sean D. Colloms, and De Witt Summers. Tangle analysis of *xer* recombination reveals only three solutions, all consistent with a single three-dimensional topological pathway. 346(2) :493–504.
- [123] N Sträter, D J Sherratt, and S D Colloms. X-ray structure of aminopeptidase A from *Escherichia coli* and a model for the nucleoprotein complex in Xer site-specific recombination. *EMBO J.*, 18(16) :4513–4522, August 1999.
- [124] Martin Reijns, Yangjie Lu, Stephen Leach, and Sean D Colloms. Mutagenesis of *PepA* suggests a new model for the Xer/*cer* synaptic complex. *Mol. Microbiol.*, 57(4) :927–941, August 2005.
- [125] Migena Bregu, David J Sherratt, and Sean D Colloms. Accessory factors determine the order of strand exchange in Xer recombination at *psi*. *EMBO J.*, 21(14) :3888–3897, July 2002.
- [126] H. I. Miller and H. A. Nash. Direct role of the *himA* gene product in phage lambda integration. 290(5806) :523–526.
- [127] H. I. Miller, A. Kikuchi, H. A. Nash, R. A. Weisberg, and D. I. Friedman. Site-specific recombination of bacteriophage lambda : the role of host gene products. 43 Pt 2 :1121–1126.
- [128] K. Abremski and S. Gottesman. Purification of the bacteriophage lambda *xis* gene product required for lambda excisive recombination. 257(16) :9658–9662.
- [129] J. F. Thompson, L. Moitoso de Vargas, C. Koch, R. Kahmann, and A. Landy. Cellular factors couple recombination with growth phase : characterization of a new component in the lambda site-specific recombination pathway. 50(6) :901–908.
- [130] K. E. Huber and M. K. Waldor. Filamentous phage integration requires the host recombinases XerC and XerD. *Nature*, 417(6889) :656–9, 2002.

- [131] Guillaume Cambray, Anne-Marie Guerout, and Didier Mazel. Integrons. 44 :141–166.
- [132] M. V. Francia, J. C. Zabala, F. de la Cruz, and J. M. Garcia Lobo. The IntI1 integron integrase preferentially binds single-stranded DNA of the attC site. *J Bacteriol*, 181(21) :6844–9, 1999.
- [133] C. Johansson, M. Kamali-Moghaddam, and L. Sundstrom. Integron integrase binds to bulged hairpin DNA. *Nucleic Acids Res*, 32(13) :4033–43, 2004.
- [134] M. Bouvier, G. Demarre, and D. Mazel. Integron cassette insertion : a recombination process involving a folded single strand substrate. *Embo J*, 24(24) :4356–67, 2005.
- [135] Marie-Eve Val, Marie Bouvier, Javier Campos, David Sherratt, François Cornet, Didier Mazel, and François-Xavier Barre. The Single-Stranded Genome of Phage CTX Is the Form Used for Integration into the Genome of *Vibrio cholerae*. *Molecular Cell*, 19(4) :559–566, August 2005.
- [136] Bhabatosh Das, Eriel Martínez, Caroline Midonet, and François-Xavier Barre. Integrative mobile elements exploiting Xer recombination. *Trends Microbiol.*, 21(1) :23–30, January 2013.
- [137] M. D. Gonzalez, C. A. Lichtensteiger, R. Caughlan, and E. R. Vimr. Conserved filamentous prophage in *Escherichia coli* O18 :K1 :H7 and *Yersinia pestis* biovar orientalis. *J Bacteriol*, 184(21) :6050–5, 2002.
- [138] Bhabatosh Das, Julien Bischerour, Marie-Eve Val, and François-Xavier Barre. Molecular keys of the tropism of integration of the cholera toxin phage. *PNAS*, 107(9) :4377–4382, February 2010.
- [139] Julien Bischerour, Claudia Spangenberg, and Francois-Xavier Barre. Holliday junction affinity of the base excision repair factor Endo III contributes to cholera toxin phage integration. *EMBO J*, 31(18) :3757–3767, September 2012.
- [140] C. M. Collis and R. M. Hall. Gene cassettes from the insert region of integrons are excised as covalently closed circles. 6(19) :2875–2885.
- [141] D. MacDonald, G. Demarre, M. Bouvier, D. Mazel, and D. N. Gopaul. Structural basis for broad DNA-specificity in integron recombination. *Nature*, 440(7088) :1157–62, 2006.
- [142] Marie Bouvier, Magaly Ducos-Galand, Céline Loot, David Bikard, and Didier Mazel. Structural features of single-stranded integron cassette attC sites and their role in strand selection. 5(9) :e1000632.
- [143] André Larouche and Paul H. Roy. Effect of attC structure on cassette excision by integron integrases. 2(1) :3.
- [144] Javier Campos, Eriel Martínez, Edith Suzarte, Boris L. Rodríguez, Karen Marrero, Yussuan Silva, Talena Ledón, Ricardo del Sol, and Rafael Fando. VGJ ϕ , a Novel Filamentous Phage of *Vibrio cholerae*, Integrates into the Same Chromosomal Site as CTX ϕ . *J. Bacteriol.*, 185(19) :5685–5696, January 2003.

- [145] Bhabatosh Das, Julien Bischerour, and François-Xavier Barre. VGJ? integration and excision mechanisms contribute to the genetic diversity of *Vibrio cholerae* epidemic strains. *PNAS*, 108(6) :2516–2521, August 2011.
- [146] Javier Campos, Eriel Martínez, Yovanny Izquierdo, and Rafael Fando. VEJ ϕ , a novel filamentous phage of *Vibrio cholerae* able to transduce the cholera toxin genes. *Microbiology*, 156(1) :108–115, January 2010.
- [147] E. J. Rubin, W. Lin, J. J. Mekalanos, and M. K. Waldor. Replication and integration of a *Vibrio cholerae* cryptic plasmid linked to the CTX prophage. *Mol Microbiol*, 28(6) :1247–54, 1998.
- [148] F. Hassan, M. Kamruzzaman, J. J. Mekalanos, and S. M. Faruque. Satellite phage TLCphi enables toxigenic conversion by CTX phage through dif site alteration. *Nature*, 467(7318) :982–5, 2010.
- [149] Carsten A. Raabe, Chee Hock Hoe, Gerrit Randau, Juergen Brosius, Thean Hock Tang, and Timofey S. Rozhdestvensky. The rocks and shallows of deep RNA sequencing : Examples in the *Vibrio cholerae* RNome. *RNA*, 17(7) :1357–1366, July 2011.
- [150] Jennifer K. Teschler, David Zamorano-Sánchez, Andrew S. Utada, Christopher J. A. Warner, Gerard C. L. Wong, Roger G. Linington, and Fitnat H. Yildiz. Living in the matrix : assembly and control of *vibrio cholerae* biofilms. 13(5) :255–268.
- [151] D. A. Herrington, R. H. Hall, G. Losonsky, J. J. Mekalanos, R. K. Taylor, and M. M. Levine. Toxin, toxin-coregulated pili, and the *toxR* regulon are essential for *Vibrio cholerae* pathogenesis in humans. *J Exp Med*, 168(4) :1487–1492, January 1988.
- [152] G. D. Pearson, A. Woods, S. L. Chiang, and J. J. Mekalanos. CTX genetic element encodes a site-specific recombination system and an intestinal colonization factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90(8) :3750–4, 1993.
- [153] S. M. McLeod and M. K. Waldor. Characterization of XerC- and XerD-dependent CTX phage integration in *Vibrio cholerae*. *Mol. Microbiol.*, 54(4) :935–47, 2004.
- [154] D. K. Karalolis, S. Somara, D. R. Maneval, J. A. Johnson, and J. B. Kaper. A bacteriophage encoding a pathogenicity island, a type-IV pilus and a phage receptor in cholera bacteria. *Nature*, 399(6734) :375–9, 1999.
- [155] A. Mutreja, D. W. Kim, N. R. Thomson, T. R. Connor, J. H. Lee, S. Kariuki, N. J. Croucher, S. Y. Choi, S. R. Harris, M. Lebens, S. K. Niyogi, E. J. Kim, T. Ramamurthy, J. Chun, J. L. Wood, J. D. Clemens, C. Czerkinsky, G. B. Nair, J. Holmgren, J. Parkhill, and G. Dougan. Evidence for multiple waves of global transmission in the seventh cholera pandemic. *Nature*, 477(7365) :462–5, 2011.
- [156] J. Chun, C. J. Grim, N. A. Hasan, J. H. Lee, S. Y. Choi, B. J. Haley, E. Taviani, Y. S. Jeon, D. W. Kim, T. S. Brettin, D. C. Bruce, J. F. Challacombe, J. C. Detter, C. S. Han, A. C. Munk, O. Chertkov, L. Meincke, E. Saunders,

- R. A. Walters, A. Huq, G. B. Nair, and R. R. Colwell. Comparative genomics reveals mechanism for short-term and long-term clonal transitions in pandemic *Vibrio cholerae*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106(36) :15442–7, 2009.
- [157] B. M. Davis and M. K. Waldor. CTXphi contains a hybrid genome derived from tandemly integrated elements. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97(15) :8572–7, 2000.
- [158] S. M. Faruque, V. C. Tam, N. Chowdhury, P. Diraphat, M. Dziejman, J. F. Heidelberg, J. D. Clemens, J. J. Mekalanos, and G. B. Nair. Genomic analysis of the Mozambique strain of *Vibrio cholerae* O1 reveals the origin of El Tor strains carrying classical CTX prophage. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104(12) :5151–6, 2007.
- [159] Eun Jin Kim, Dokyung Lee, Se Hoon Moon, Chan Hee Lee, Sang Jun Kim, Jae Hyun Lee, Jae Ouk Kim, Manki Song, Bhabatosh Das, John D. Clemens, Jean William Pape, G. Balakrish Nair, and Dong Wook Kim. Molecular Insights Into the Evolutionary Pathway of *Vibrio cholerae* O1 Atypical El Tor Variants. *PLoS Pathog.*, 10(9) :e1004384, September 2014.
- [160] M. Kamruzzaman, William Paul Robins, S. M. Nayeemul Bari, Shamsun Nahar, John J. Mekalanos, and Shah M. Faruque. RS1 Satellite Phage Promotes Diversity of Toxigenic *Vibrio cholerae* by Driving CTX Prophage Loss and Elimination of Lysogenic Immunity. *Infect. Immun.*, 82(9) :3636–3643, September 2014.
- [161] N. M. Dominguez, K. T. Hackett, and J. P. Dillard. XerCD-mediated site-specific recombination leads to loss of the 57kb gonococcal genetic island. *J Bacteriol*, 2010.
- [162] S. E. Nunes-DÃEby, D. Yu, and A. Landy. Sensing homology at the strand-swapping step in lambda excisive recombination. 272(4) :493–508.
- [163] K. C. Woods, S. S. Martin, V. C. Chu, and E. P. Baldwin. Quasi-equivalence in site-specific recombinase structure and function : crystal structure and activity of trimeric cre recombinase bound to a three-way lox DNA junction. 313(1) :49–69.
- [164] D. N. Gopaul and G. D. Duyne. Structure and mechanism in site-specific recombination. *Curr Opin Struct Biol*, 9(1) :14–20, 1999.
- [165] C. Alen, D. J. Sherratt, and S. D. Colloms. Direct interaction of aminopeptidase A with recombination site DNA in Xer site-specific recombination. *EMBO J.*, 16(17) :5188–97, 1997.
- [166] Wenjun Tong, David Warren, Nicole E. Seah, Gurunathan Laxmikanthan, Gregory D. Van Duyne, and Arthur Landy. Mapping the lamda integrase bridges in the nucleoprotein holliday junction intermediates of viral integrative and excisive recombination. 111(34) :12366–12371.
- [167] F. Hayes and D. J. Sherratt. Recombinase binding specificity at the chromosome dimer resolution site dif of *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.*, 266(3) :525–37, 1997.

- [168] L. K. Arciszewska, R. A. Baker, B. Hallet, and D. J. Sherratt. Coordinated control of XerC and XerD catalytic activities during Holliday junction resolution. *J. Mol. Biol.*, 299(2) :391–403, 2000.
- [169] Thomas H Massey, Laurent Aussel, François-Xavier Barre, and David J Sherratt. Asymmetric activation of Xer site-specific recombination by FtsK. *EMBO Rep.*, 5(4) :399–404, April 2004.
- [170] K. H. Thelin and R. K. Taylor. Toxin-coregulated pilus, but not mannose-sensitive hemagglutinin, is required for colonization by *Vibrio cholerae* O1 El Tor biotype and O139 strains. *Infect Immun*, 64(7) :2853–6, 1996.
- [171] Florian Fournes, Estelles Crozat, Carine Pages, Catherine Tardin, Laurence Salomé, François Cornet, and Philippe Rousseau. FtsK translocation permits discrimination between an endogenous and an imported xer/dif recombination complex. 113(28) :7882–7887.
- [172] Hafez El Sayyed, Ludovic Le Chat, Elise Lebailly, Elise Vickridge, Carine Pages, Francois Cornet, Marco Cosentino Lagomarsino, and Olivier Espéli. Mapping Topoisomerase IV Binding and Activity Sites on the *E. coli* Genome. *PLoS Genet.*, 12(5) :e1006025, May 2016.
- [173] W. W. Steiner and P. L. Kuempel. Sister chromatid exchange frequencies in *Escherichia coli* analyzed by recombination at the dif resolvase site. *J. Bacteriol.*, 180(23) :6269–75, 1998.
- [174] Stephen C. Kowalczykowski. An overview of the molecular mechanisms of recombinational DNA repair. 7(11).
- [175] Christophe Possoz, Ivan Junier, and Olivier Espeli. Bacterial chromosome segregation. 17 :1020–1034.
- [176] Ariane David, Gaëlle Demarre, Leila Muresan, Evelyne Paly, François-Xavier Barre, and Christophe Possoz. The two Cis-acting sites, parS1 and oriC1, contribute to the longitudinal organisation of *Vibrio cholerae* chromosome I. *PLoS Genet.*, 10(7) :e1004448, July 2014.
- [177] Ariane David, Gaëlle Demarre, Leila Muresan, Evelyne Paly, François-Xavier Barre, and Christophe Possoz. The Two Cis-Acting Sites, parS1 and oriC1 , Contribute to the Longitudinal Organisation of *Vibrio cholerae* Chromosome I. *PLOS Genet*, 10(7) :e1004448, 2014.
- [178] René van der Ploeg, Jolanda Verheul, Norbert O. E. Vischer, Svetlana Alexeeva, Eelco Hoogendoorn, Marten Postma, Manuel Banzhaf, Waldemar Vollmer, and Tanneke den Blaauwen. Colocalization and interaction between elongasome and divisome during a preparative cell division phase in *escherichia coli*. 87(5) :1074–1087.
- [179] Norbert O. E. Vischer, Jolanda Verheul, Marten Postma, Bart van den Berg van Saparoea, Elisa Galli, Paolo Natale, Kenn Gerdes, Joen Luirink, Waldemar Vollmer, Miguel Vicente, and Tanneke den Blaauwen. Cell age dependent concentration of *escherichia coli* divisome proteins analyzed with ImageJ and ObjectJ. 6 :586.

- [180] Kathryn E. Moyer, Harvey H. Kimsey, and Matthew K. Waldor. Evidence for a rolling-circle mechanism of phage DNA synthesis from both replicative and integrated forms of CTX ϕ . *Molecular Microbiology*, 41(2) :311–323, July 2001.
- [181] Matthew K. Waldor, Eric J. Rubin, Gregory D. N. Pearson, Harvey Kimsey, and John J. Mekalanos. Regulation, replication, and integration functions of the *Vibrio cholerae* CTX ϕ are encoded by region RS2. *Molecular Microbiology*, 24(5) :917–926, June 1997.
- [182] Javier Campos, Eriel Martínez, Karen Marrero, Yussuan Silva, Boris L. Rodríguez, Edith Suzarte, Talena Ledón, and Rafael Fando. Novel Type of Specialized Transduction for CTX ϕ or Its Satellite Phage RS1 Mediated by Filamentous Phage VGJ ϕ in *Vibrio cholerae*. *J. Bacteriol.*, 185(24) :7231–7240, December 2003.
- [183] M. K. Waldor and J. J. Mekalanos. Lysogenic conversion by a filamentous phage encoding cholera toxin. *Science*, 272(5270) :1910–4, 1996.
- [184] Nicolas Carraro and Vincent Burrus. Biology of Three ICE Families : SXT/R391, ICEBs1, and ICEst1/ICEst3. *Microbiol Spectr*, 2(6), December 2014.

Table des figures

1.1	Résolution des caténanes et dimères de chromosomes	17
1.2	Structure cristallographique de la protéine XerD . .	20
1.3	Comparaison de la structure des domaines Cter de XerD (<i>E.coli</i>), λ Int. et HPI Int.	21
1.4	Schéma représentant les différents évènements de recombinaisons pouvant être catalysés par les recombinaisons à Tyrosine	23
1.5	Recombinaison spécifique de site des recombinaisons à Tyrosine :	23
1.6	Alignement des XerCD de <i>V.cholerae</i> avec celles d' <i>E.coli</i> , à partir du logiciel Clustal	24
1.7	Structure de l'état de transition Cre - ADN	25
1.8	Alignement des sites <i>dif</i>	26
1.9	Structure en représentation en ruban d'un dimère Cre sur un site <i>loxA</i> (dérivé de <i>loxP</i>)	28
1.10	Comparaison des structures obtenues de XerD(1a0p) et Cre(4crx)	29
1.11	Structure d'une synapse Cre/ <i>loxA</i> en cours d'échange	32
1.12	Localisation des insertions du pentapeptide dans la protéine XerD de <i>S.typhimurium</i>	33
1.13	Structure et séquence des recombinaisons	34

1.14	Contrôler l'issue de la recombinaison	36
1.15	Les différentes voies de recombinaison possibles pour XerCD	39
1.16	Représentation schématique de la protéine FtsK . .	41
1.17	Structure cristallographique de la protéine FtsK . .	43
1.18	Modèle d'escorte et de rotation lors de la translocati- on de SpoIIIE	45
1.19	Rôle des KOPS dans la régulation de la translocation de l'ADN par FtsK	46
1.20	Décaténation par XerCD-FtsK vs TopoIV	50
1.21	Sites <i>cer</i> et <i>psi</i> et topologie du produit de recombinaison	53
1.22	Le filtre topologique contrôle la catalyse de Xer pour la résolution des dimères de plasmides	55
1.23	Modèle du filtre topologique exercé par PepA et ArgR sur un site <i>cer</i>	56
1.24	Intégrations successives des IMEXs dans un site <i>dif</i>	59
1.25	Capture de gènes par les intégrons et modèle d'intégration de cassette	61
1.26	Le repliement en épingle à cheveux de l'ADN simple brin de CTX forme un site $attP^{CTX}$ fonctionnel et utilisé pour l'intégration via XerC et XerD.	62
1.27	Représentation schématique des sites $attP$ de type $CTX\phi$	63
1.28	Voie d'intégration des IMEXs de type $CTX\phi$	64
1.29	Représentation schématique du site d'attachement des IMEXs de type $VGJ\phi$	66
1.30	Voie d'intégration des IMEXs de type $VGJ\phi$	67

1.31	Représentation schématique du site d'attachement des IMEXs de type $TLC\phi$	68
1.32	Représentation schématique du génome du phage satellite TLC	69
2.1	Schéma représentant les variations de compositions en IMEXs intégrés au chromosome I et II chez <i>V.cholerae</i> au sein de la même souche pandémique O1 El Tor responsable de la 7ème pandémie	75
2.2	Arbre phylogénétique (maximum de vraisemblance) des souches de <i>V.cholerae</i> responsables de la 7ème pandémie	76
2.3	Schéma de la structure synaptique représentant un clivage en <i>cis</i> ou en <i>trans</i> par la Tyrosine catalytique	91
2.4	Cinétique de perte du plasmide intégratif-TLC au cours du temps	95
2.5	Proposition d'évènement de recombinaison ayant conduit à la délétion de la totalité des IMEXs présent sur la chromosome I de <i>V. cholerae</i>	97
2.6	Table d'excision des IMEXs lors de la surexpression de la réponse SOS	98
3.1	Alignment of <i>dif1</i> site and <i>attPTLC</i> site	103
3.2	Schematic linear representation of deletions made in TLC genome	105
3.3	Complementation <i>in trans</i> with VC1465 under <i>pAra</i> promotor	106
3.4	<i>in vitro</i> recombination between <i>attPTLC</i> and <i>dif1</i>	108
3.5	<i>In vitro</i> recombination between two <i>dif1</i> sites . . .	110

3.6	recombination between <i>attPTLC</i> and <i>dif1</i> when removing TLC genome on XerD side	111
3.7	sequencing gel of <i>dif1/dif1</i> recombination while reducing the size of non-labelled substrate	112
3.8	XafT recovering in pull down assay of different MBP-tagged proteins	115
3.9	XerD recovering in pull down assay of MBP-XerC, with XafT and <i>dif1</i> /or <i>attPTLC</i> sites	116
3.10	Table S4 : Statistical analysis of XerD recovering in pull down experiment with MBP-XerC	117
3.11	Gel shift d'un site <i>dif1</i> versus ADN non spécifique en présence de XafT et / ou XerD	131
3.12	Gel shift d'un site <i>dif1</i> versus ADN non spécifique en présence de XafT, XerD et / ou XerC	133
3.13	Modèle 1 : XafT induit un changement conformationnel de XerD	134
3.14	Modèle 2 : XafT reconnaît le site de fixation de XerC et charge XerD	135
3.15	Représentation graphique de la fréquence d'excision d'un pTLC à partir du chromosome	136
3.16	Le contexte ADN du site <i>attPTLC</i> côté XerD affecte l'efficacité de recombinaison	139
4.1	Table récapitulative de l'essai d'intégration de TLC en présence des XerCD d' <i>E.coli</i>	142
4.2	Gel de protéine montrant l'enrichissement de XafT en présence de MBP-XerD de <i>V.cholerae</i> ou <i>E.coli</i>	143
4.3	Dépendance à RecA lors d'essais d'excision de cassette en LB	145

4.4	Graphique représentant la dépendance de la recombinaison Xer à RecA en fonction des Xer utilisées .	146
4.5	Représentation graphique de l'excision de cassette <i>dif/dif</i> en milieu riche versus milieu minimum chez <i>E.coli</i>	148
4.6	Représentation graphique des résultats de snapshot pour la localisation des Ter de <i>V.cholerae</i>	150
4.7	Représentation graphique des résultats de snapshot pour la localisation des Ter de <i>E.coli</i>	152
4.8	Démographe représentant la localisation relative du Ter de <i>E. coli</i> au court du cycle cellulaire	153
5.1	Recombinaison XerD indépendante de FtsK chez <i>V.cholerae</i> et sur des sites hybrides <i>dif</i>	162
5.2	Représentation partielle de l'ORF VC1465 et de son cadre de lecture codant pour XafT	163
5.3	Recombinaison <i>in vitro</i> entre deux sites <i>dif1</i> en différentes concentrations de glycérol	164
5.4	Recombinaison <i>in vitro</i> entre deux sites <i>dif</i> d' <i>E.coli</i> et avec les recombinases XerCD de <i>V.cholerae</i> . . .	166
5.5	L'ORF136 est impliquée dans l'intégration de VGJ	167
5.6	Alignement des sites <i>dif</i> présents chez <i>Neisseria</i> et des sites <i>attP</i> des GI ciblant cette bactérie	169
6.1	Schéma représentant le substrat ADN et le principe du suivi de la formation d'une synapse de recombinaison Xer en temps réel	185

6.2	Suivi en temps réel de l'efficacité de FRET de Cy3B vers Cy5 lors de la formation de synapse XerCD _{E.coli} sur deux sites <i>dif</i> _{E.coli}	186
6.3	Suivi en temps réel de l'efficacité de FRET de Cy3B vers Cy5 lors de la formation de synapse XerCD _{V.ch.} sur deux sites <i>dif</i> _{E.coli}	187
6.4	Suivi en temps réel de l'efficacité de FRET de Cy3B vers Cy5 lors de l'activation d'une synapse XerCD _{V.ch.} sur deux sites <i>dif</i> _{E.coli} et sous l'influence de XafT . . .	188

Titre : Mécanisme d'intégration du phage TLC dans le génome de *V. cholerae*

Mots clés : phage, Xer, recombinaison, *Vibrio cholerae*.

Résumé : La plupart des bactéries ont un unique chromosome circulaire avec une origine de répllication unique. L'ADN est une hélice double-brin qui lors de la répllication va être soumise à des contraintes topologiques. Dans le cas des chromosomes circulaires, ces contraintes topologiques peuvent lier les deux chromatides soeurs résultant de la répllication (caténanes et dimères). Ces liens topologiques doivent être résolus afin de permettre une bonne ségrégation de l'information génétique entre les deux cellules filles au cours de la division cellulaire. Les bactéries possèdent une machinerie très conservée : les recombinases à Tyrosines XerC et XerD, capables de résoudre les dimères et une partie des caténanes, en catalysant un crossing-over au site dif, situé dans la région Ter du chromosome. Lors de ce processus, elles réalisent successivement deux échanges de brins.

La réaction Xer est contrôlée spatialement et temporellement par une protéine du divisome : FtsK. FtsK est une translocase qui pompe l'ADN à travers le septum de division. Lorsqu'elle rencontre une synapse constituée de deux sites dif chargés de XerC et XerD, elle active XerD pour qu'elle initie le premier échange de brins. Dans un second temps XerC catalyse un second échange de brins indépendamment de FtsK. À ce jour le mécanisme d'activation de XerD n'est pas compris. Certains éléments mobiles résolvent leurs états multimériques (tels que les plasmides) ou intègrent leur génome dans celui de leur hôte en détournant les recombinases XerC et XerD. On parle d'IMEXs (Integrative Mobile Element using Xer). Les éléments mobiles étudiés avant ma thèse utilisaient tous des voies de recombinaisons initiées par la catalyse de XerC et ne nécessitant pas l'activation de XerD.

Au cours de ma thèse, j'ai étudié dans un premier temps le mécanisme d'intégration / excision du phage TLC de *Vibrio cholerae*, la bactérie responsable du choléra. Par des approches de génétique, j'ai démontré que TLC définit une nouvelle catégorie d'IMEXs. Il utilise une voie de recombinaison où le premier échange de brins est catalysé par XerD et indépendant de FtsK. Mes travaux ont également montré que l'excision du phage participe à l'évolution des souches pandémiques de *V. cholerae*.

J'ai identifié un facteur phagique qui permet à TLC de contourner le contrôle de FtsK sur l'activation de XerD. Ce facteur est une protéine de fonction inconnue présentant un domaine HTH (Hélice-Tour-Hélice) et un domaine de fonction inconnue DUF3653. Ce dernier est retrouvé dans de nombreux IMEXs. Puis par des approches de biologie moléculaire, j'ai étudié le mécanisme d'action de cette protéine. J'ai reproduit la réaction de recombinaison *in vitro* et démontré qu'elle active XerD en interagissant directement avec elle.

Enfin, nous nous sommes intéressés aux disparités observées entre la recombinaison Xer chez *E. coli* et *V. cholerae*. En particulier, la recombinaison Xer semble agir seulement sur les dimères chez *E. coli* alors qu'elle est active également sur les monomères chez *V. cholerae*. Nous avons montré que ces divergences de comportement ne viennent pas des Xer elles-mêmes, ni de leur activation par FtsK. Elles résultent des différences de chorégraphie et de la vitesse de ségrégation des chromosomes frères, dans ces deux bactéries et en fonction de leurs conditions de croissance.

Title: Mechanism of integration of the phage TLC into the genome of *V. cholerae*

Keywords : phage, Xer, recombination, *Vibrio cholerae*.

Abstract: Most of bacteria have a single circular chromosome. During replication of DNA, this circularity can lead to two sister chromatids topologically linked (catenanes and dimers). These topological links have to be solved in order to allow good segregation of genetic information between the two daughter cells during cell division. Bacteria possess a highly conserved machinery : the tyrosine recombinases XerC XerD that are capable of resolving dimers and some catenanes, by catalyzing a crossover at the specific site dif located in the Ter region of the chromosome. During this process they realize two sequential strand exchanges.

The Xer reaction is spatiotemporally controlled by a protein of the divisome : FtsK. FtsK is a pump that translocates DNA through the septum of division. When FtsK meets a synapse that consists of two dif loaded by XerC and XerD, it activates XerD catalysis that initiates first strand exchange. Secondly XerC catalyzes a second strand exchange independently of FtsK. To date the activation mechanism of XerD is not well understood. Some mobile elements solve their multimeric states (like plasmids) or integrate their genome into the chromosome of their host by using XerCD recombinases. Such integrative elements are named IMEXs (Integrative Mobile Element using Xer). The mobile elements studied before my thesis all used recombination pathways initiated by catalysis of XerC and not requiring activation of XerD.

During my PhD I studied at first the integration / excision mechanism of a new class of IMEXs using as a model the TLC phage *Vibrio cholerae*, the bacterium responsible for cholera. By genetic approaches I demonstrated that TLC uses a recombination pathway initiated by XerD catalysis and independently of FtsK. My work has also shown that the phage excision participates in the evolution of pandemic strains of *V. cholerae*.

In the second part, I identified a phage factor that allows TLC to bypass the activation of XerD by FtsK. This factor was a protein of unknown function with a HTH domain and a DUF3653 domain. DUF3653 are found in many IMEXs. Using molecular biology approaches, I studied the mechanism of action of this protein. I reproduced the recombination reaction *in vitro* and demonstrated that this factor activates XerD by directly interacting with it.

Finally, we were interested to study disparities between Xer recombination in *E. coli* and *V. cholerae*. In particular, the Xer recombination seems to act only on dimers in *E. coli* while it is also active on monomers in *V. cholerae*. We have demonstrated that these differences in behaviors do not come from Xer themselves or their activation by FtsK. They result from different choreographies of chromosome segregation between these two bacteria and are also dependent on growth rates.

