



HAL
open science

Implication de DciA dans l'initiation de la réplication bactérienne. Étude chez *Vibrio cholerae*

Yazid Adam

► **To cite this version:**

Yazid Adam. Implication de DciA dans l'initiation de la réplication bactérienne. Étude chez *Vibrio cholerae*. Biochimie, Biologie Moléculaire. Université Paris-Saclay, 2020. Français. NNT : 2020UP-ASS114 . tel-02903584

HAL Id: tel-02903584

<https://theses.hal.science/tel-02903584>

Submitted on 21 Jul 2020

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.

Implication de DciA dans l'initiation de la réplication bactérienne. Étude chez *Vibrio cholerae*

Thèse de doctorat de l'université Paris-Saclay

École doctorale n°577, structure et dynamique des systèmes vivants (SDSV)
Spécialité de doctorat: Sciences de la vie et de la santé
Unité de recherche : Université Paris-Saclay, CEA, CNRS, Institute for Integrative Biology of
the Cell (I2BC), 91198, Gif-sur-Yvette, France
Réfèrent : Faculté des sciences d'Orsay

**Thèse présentée et soutenue en visioconférence totale,
le 4/06/2020 par**

Yazid ADAM

Composition du Jury

Marc NADAL Professeur, Institut Jacques-Monod	Président
Olivier ESPELI Directeur de recherche, Collège de France	Rapporteur & Examineur
Marie-Noëlle PRIOLEAU Directeur de recherche, Institut Jacques-Monod	Rapporteuse & Examinatrice
Olivier HACCARD Directeur de recherche, I2BC	Examineur
Roxane LESTINI Maître de conférence, Ecole Polytechnique	Examinatrice
Christophe POSSOZ Chargé de recherche, I2BC	Examineur
Jean-Luc FERAT Maître de conférence, UVSQ, I2BC	Directeur de thèse

Notes

Trois grandes parties constituent le corps de ce travail, l'introduction, les résultats et la discussion. Les figures jointes et attenantes à chacune d'elles sont numérotées avec les préfixes I, R et D suivi de chiffres ; cela donne Figure I#, Figure R# et Figure D# respectivement pour les parties Introduction, Résultats et Discussion. Les figures attenantes à l'article joint à ce travail sont numérotés quant à elles de manière classique.

Les remerciements adressés à l'ensemble des personnes qui ont contribué à cet aboutissement se retrouvent dans la version imprimée de cette thèse, accessible à cesdites personnes, aux proches et amis. Que l'ensemble de ces personnes retrouvent néanmoins encore une fois ici, l'expression de ma profonde gratitude et toute ma reconnaissance.

Je tenais néanmoins à remercier ici vivement, les hommes et femmes par qui les réseaux de recherche financés par la Région Ile-de-France et labélisés Domaine d'Intérêt Majeur (DIM) vivent ; et tout particulièrement, ceux qui ont permis la réalisation de cette thèse, le DIM Malinf ; qu'ils retrouvent ici de même, mes remerciements et ma profonde gratitude. Merci à eux tous...

Table des matières

INTRODUCTION

Chapitre 1. L'initiation de la réplication chez le modèle <i>Escherichia coli</i>	3
L'organisation d'<i>oriC</i> et la formation du complexe ouvert	4
Gestion de l'hélicase répllicative DnaB lors de l'initiation de la réplication	5
Le complexe de pré-amorçage ou «pre-priming complex »	5
Le complexe d'amorçage ou «priming complex»	5
Assemblage du réplisome ou holoenzyme Polymérase III	6
Régulation de l'initiation de la réplication chez <i>E. coli</i>	8
La séquestration d' <i>oriC</i>	9
Le mécanisme RIDA.....	9
Titration de DnaA-ATP et régénération	10
Le redémarrage des fourches de réplication	11
Quelques causes d'arrêt et/ou de dislocation du réplisome	12
Traitement des réplisomes disloquées.....	13
Formation du primosome	14
Chapitre 2. Les hélicases de la réplication	16
Les hélicases réplicales	16
Les hélicases réplicales de type-DnaB	16
Chez les bactéries	17
<i>Chez les plasmides</i>	19
La réplication Thêta.....	20
La réplication « Strand Displacement » : l'hélicase RepA	21
Chez les phages	22
Les hélicases réplicales de type-MCM	24
Les hélicases non réplicales UvrD et Rep d'<i>Escherichia coli</i>	25
L'hélicase UvrD	25
L'hélicase Rep	25
Problématique, présentation de <i>Vibrio cholerae</i> et principaux résultats...	27
RÉSULTATS	
Partie I : Les hélicases des organismes à DciA se chargent seules <i>in vitro</i> ..	33
Article : Replicative helicases of <i>dciA</i> -species are DNA self-loading enzymes (pp.1-45)	
Exploration de l'implication de la sérine 296 de DnaB dans l'interaction avec DciA.....	34
Interaction entre DciA et DnaB-Analyse de la liaison hydrogène par approche double hybride.....	35
Interaction entre DciA et DnaB-Analyse <i>in vivo</i> par mutagenèse ciblée	36
Partie II : DciA n'est pas indispensable à la charge de l'hélicase répllicative <i>in vivo</i>	38
Partie III : Remplacement de DciA par DnaC/DnaT	51
DISCUSSION	53
Annexes	58
Bibliographie.....	62

INTRODUCTION

Préambule

Le chapitre 1 rappelle le processus d'initiation de la réplication chez l'organisme modèle *Escherichia coli* tel que connu. Le choix de cet organisme tient au fait que les connaissances qui y ont été accumulées, peuvent s'agencer de manière linéaire afin de comprendre ce processus dans son ensemble et de manière simple. Ainsi, je présente l'ensemble des facteurs intervenant dans l'initiation de la réplication d'*E. coli*, les différentes étapes remarquables du processus, ainsi que les mécanismes de régulation. J'aborde également les modalités qui permettent la ré-initiation de la réplication lorsque la machinerie de réplication s'arrête ou est disloquée. Diverses causes conduisent à l'arrêt du réplisome, celles-ci sont présentées.

Dans le chapitre 2, j'introduis ce qu'est une hélicase réplicative car les premiers résultats obtenus lors de la caractérisation de DciA suggèrent un rôle dans la gestion de l'hélicase réplicative notamment après la formation du complexe ouvert (Brézellec *et al.* 2016). J'insiste sur la gestion des hélicases réplicatives "bactériennes", en particulier sur la charge de ces hélicases sur l'ADN. Celle-ci est perçue comme exclusivement et essentiellement dépendante de facteurs nommés "chargeurs d'hélicases". En présentant quelques connaissances de la littérature concernant les hélicases réplicatives bactériennes, cette perception se remet d'elle-même en cause. Les modalités de gestion des hélicases eucaryotes sont aussi présentées dans un but comparatif. Deux autres hélicases, non réplicatives, UvrD et Rep sont présentées parce qu'impliquées dans le bon déroulement de la réplication.

La problématique qui suit, nous fait entrer en plein dans le sujet de ma thèse ; en présentant d'où vient DciA, les questions posées, la justification et la présentation de l'organisme modèle étudié ici, *Vibrio cholerae*.

Chapitre 1. L'initiation de la réplication chez le modèle *Escherichia coli*

L'initiation de la réplication du chromosome bactérien démarre à une séquence spécifique (*oriC*), laquelle chez les bactéries, est un locus contenant des motifs (boîtes DnaA, sites τ , C et I) reconnus spécifiquement par une protéine initiateuse de la réplication dont le rôle, à terme, est de conduire à l'ouverture localisée, à *oriC*, du chromosome bactérien.

Chez l'organisme modèle *Escherichia coli*, DnaA est la protéine initiateuse de la réplication. La protéine DnaA se lie à l'adénosine triphosphate (ATP) ou à l'adénosine diphosphate (ADP) ; la forme active – celle qui participe à l'initiation de la réplication – est celle liée à l'ATP (DnaA-ATP). Elle s'oligomérisse à *oriC*, et en association avec d'autres protéines (HU, IHF et DiaA) entraîne l'ouverture de régions riches en AT au niveau de l'origine de réplication pour former le complexe ouvert (Figure I1) (Leonard et Grimwade 2015).

Après la formation du complexe ouvert, DnaA recrute l'hélicase répliquative bactérienne DnaB à l'origine de réplication, sous sa forme complexée à la protéine DnaC aussi connu sous le nom de chargeur d'hélicase. Deux molécules d'hélicases répliquatives ainsi recrutées à *oriC* peuvent ensuite se charger sur les simples brins de la molécule d'ADN parentale, générés lors de la formation du complexe ouvert toujours sous leur forme complexée à DnaC ; c'est le complexe de pré-amorçage (Chovadarapu et Kaguni 2016) (Figure I1).

L'hélicase répliquative DnaB est inactive lorsque complexée au chargeur DnaC (Chovadarapu et Kaguni 2016) ; l'interaction de la primase DnaG - l'ARN polymérase responsable la synthèse d'amorces ARN qui servent de substrats initiaux à l'élongation de nouveaux brins d'ADN par l'ADN polymérase III - avec DnaB, conduit à dissocier le chargeur DnaC et à activer l'hélicase répliquative. Celle-ci démarre alors la séparation des deux brins de la molécule d'ADN et élargit de même le complexe ouvert. La primase DnaG

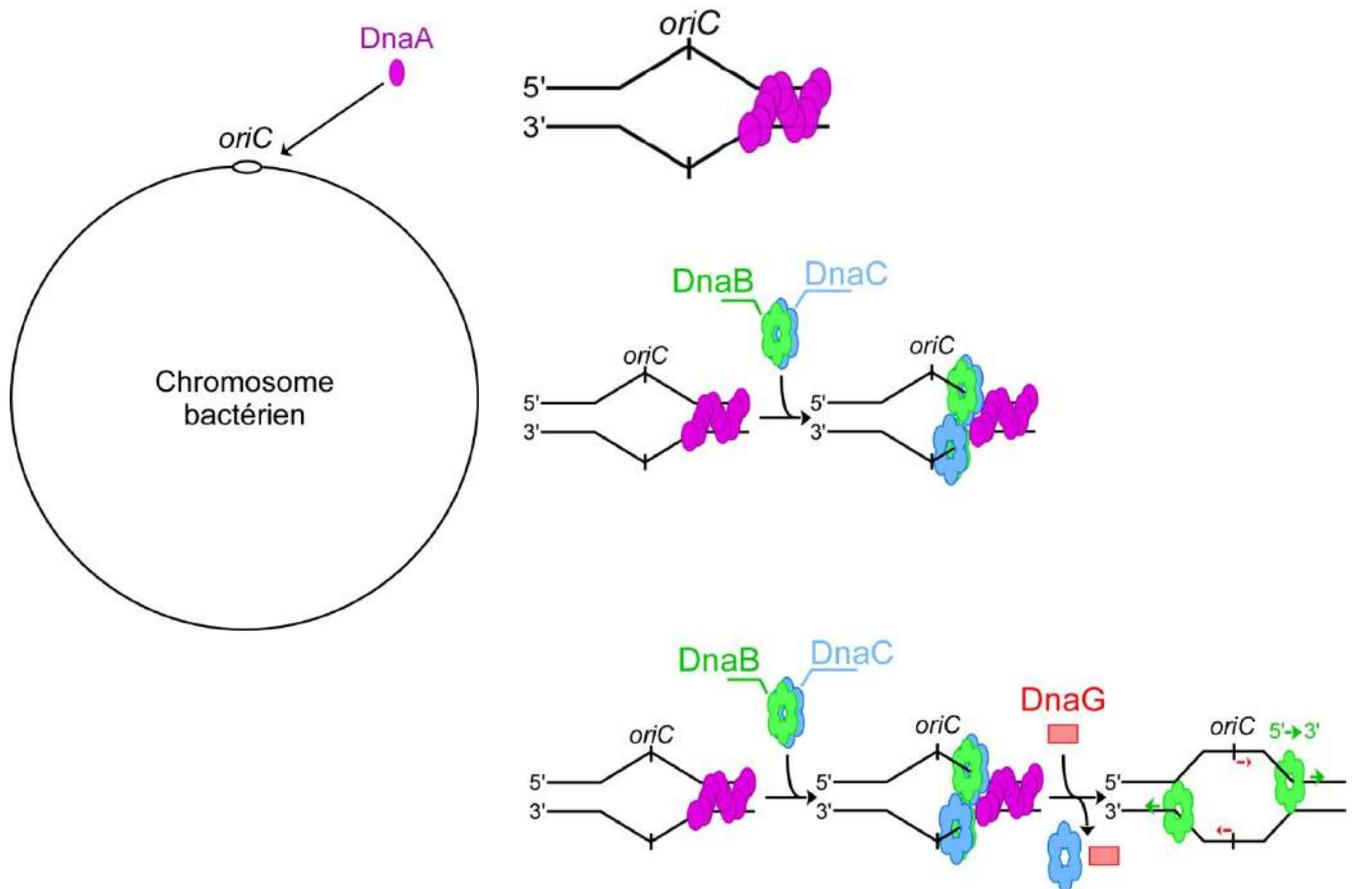


Figure I1. L'initiation de la réplication chez *Escherichia coli*. Le chromosome bactérien est localement ouvert à *oriC* suite au recrutement de la protéine DnaA qui s'oligomérisse sur des motifs spécifiques présents à l'origine de réplication: c'est le complexe ouvert. Deux molécules hexamériques de DnaB sont ensuite chargées sur les brins simples en association avec DnaC. L'association ultérieure de la primase DnaG avec l'hélicase DnaB conduit à la dissociation de DnaC, à l'activation de DnaB qui élargi le complexe ouvert et permet la synthèse d'amorce ARN.

synthétise ensuite les amorces ARN (Figure I1). L'association entre la primase DnaG et DnaB représente le complexe d'amorçage.

L'organisation d'*oriC* et la formation du complexe ouvert

Chez *E. coli*, la séquence du locus *oriC* mesure 250 paires de bases (bp) et est localisée entre les gènes *gidA* et *mioC* à 84,3 min sur la carte génétique du chromosome d'*E. coli* (Leonard et Grimwade 2015; Oka *et al.* 1980). *oriC* présente différentes séquences remarquables. Les premières appelées « boîtes DnaA » notées R1 à R5 (Figure I2) sont considérées comme les sites primaires de fixation de la forme active de la protéine DnaA (DnaA-ATP) et lui sont de fortes affinités. Des séquences nommées τ , C et I de plus faibles affinités pour DnaA sont distribuées entre les sites R1 à R5 (Figure I2). A gauche de la boîte R1, se trouve une région constituée d'un motif de treize nucléotides (13-mers), répété trois fois (L, M, R) (Figure I2). Cette région instable et riche en nucléotides AT, est appelée DUE (DNA Unwinding Element).

Lors de l'initiation de la réplication, la protéine DnaA-ATP se lie aux sites de fortes affinités R1 et R5 à l'origine de réplication. Ces liaisons entraînent de manière coopérative l'aggrégation de nouveaux monomères de DnaA-ATP aux sites R2, R3, R7 puis sur les sites de faibles affinités τ , C et I. A cette étape, les molécules de DnaA sont fixées à *oriC* sous forme oligomérique. La formation d'oligomères de DnaA-ATP est stimulée par la protéine IHF (Integration Host Factor) connue pour tordre la molécule d'ADN. En se liant à son site présent à l'origine de réplication (Figure I2), IHF rapproche spatialement, en courbant le duplex ADN, les sites DUE et R1 d'une part et R2, R3, R4, R5 d'autre part. Ce rapprochement permet l'aggrégation par coopérativité de DnaA-ATP et favorise la déstabilisation du DUE qui conduit à la séparation localisée des deux brins de la molécule d'ADN : c'est le complexe ouvert (Figure I1) (Hwang et Kornberg 1992 ; Grimwade *et al.* 2000).

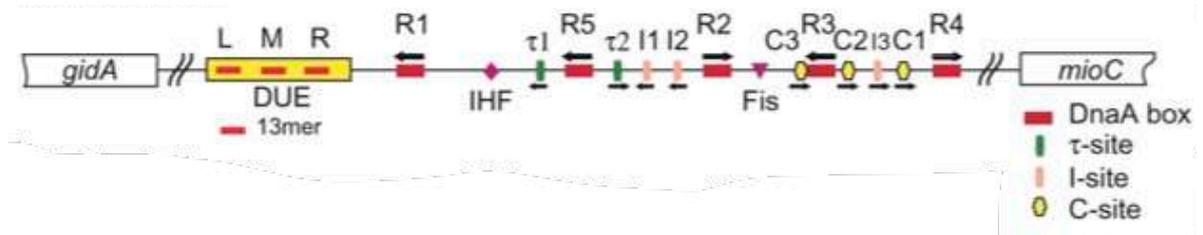


Figure I2. Organisation d'*oriC*. (Chovadarapu et Kaguni 2016). Les motifs caractéristiques du locus *oriC* énoncés dans le texte sont indiqués les uns par rapport aux autres. La localisation des gènes *gidA* et *mioC* est également indiquée.

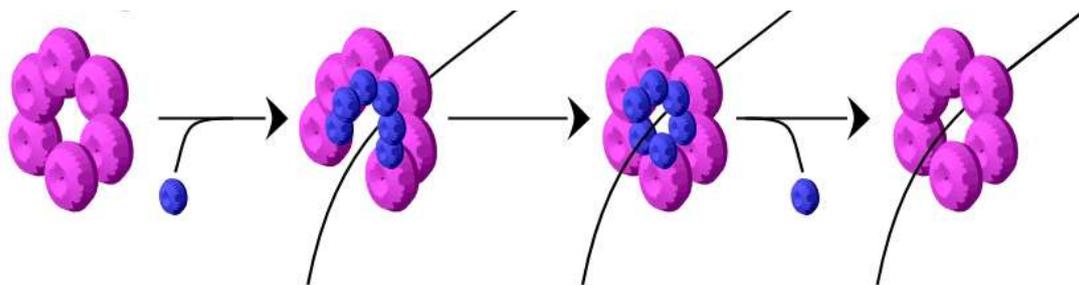


Figure I3. DnaC ouvre l'hexamère de DnaB. L'hexamère de DnaB (en violet) est déstabilisé à l'une des interfaces de ces sous-unités par le chargeur DnaC (en bleu). L'ouverture générée permet à l'hélicase d'accéder à l'ADN simple brin puis l'anneau se referme. La dissociation ultérieure de DnaC active l'hélicase répliquative.

Gestion de l'hélicase répliquative DnaB lors de l'initiation de la réplication

- Le complexe de pré-amorçage ou «pre-priming complex »

Après la formation du complexe ouvert, deux molécules hexamériques de DnaB, en association avec six monomères de DnaC (Figure I1) sont recrutées au niveau de l'origine de réplication puis chargées sur les brins simples d'ADN générés lors de la formation du complexe ouvert. Le recrutement du complexe DnaB:DnaC se fait par interaction de DnaB avec le domaine I de DnaA (Chovadarapu et Kaguni. 2016; Makowska-Grzyska et Kaguni 2010). Les hexamères, de DnaB, sont organisées en anneaux fermés (Arias-Palomo *et al.* 2013). Pour permettre leur accessibilité à la molécule d'ADN, la rupture de l'anneau est nécessaire. Cette tâche est assurée par le chargeur d'hélicase DnaC (Arias-Palomo *et al.* 2013). Les six monomères de DnaC organisés en spirale droite se lient aux domaines C-terminaux de chaque monomère de l'hélicase répliquative; ceci entraîne une déstabilisation de l'anneau de DnaB à une des interfaces formées par deux monomères de DnaB (Arias-Palomo *et al.* 2013). L'ouverture qui en résulte permet le passage des brins simples d'ADN générés lors de la formation du complexe ouvert et l'hélicase répliquative est ainsi chargée à l'origine de réplication (Figure I3). A cette étape, les deux molécules d'hélicases répliquatives chargées en association avec DnaC (DnaB:DnaC) sont inactives.

- Le complexe d'amorçage ou «priming complex »

Afin de permettre la synthèse de nouveaux brins d'ADN, la primase (DnaG) synthétise des amorces ARN qui servent de substrat initial à la machinerie de réplication. La synthèse de ces amorces requiert l'extension du complexe ouvert qui est assurée par DnaB. La primase DnaG en se liant à DnaB provoque un changement de conformation de l'hélicase qui conduit à une déstabilisation du complexe de pré-amorçage puis à la libération du chargeur DnaC (Makowska-Grzyska et Kaguni 2010). L'hélicase DnaB devient

active et étend la configuration simple brin de part et d'autre de *oriC* (Johnson et O'Donnell 2005) (Figure I1). La primase DnaG, toujours liée à DnaB initie ensuite la formation des amorces ARN. Une fois les amorces ARN synthétisées, l'assemblage de la machinerie de réplication ou réplisome se fait sur le substrat hybride ADN-ARN formé, à l'extrémité 3' de l'amorce ARN (Johnson et O'Donnell 2005).

L'assemblage du réplisome ou holoenzyme Polymérase III

Le réplisome est un complexe multiprotéique constitué de trois éléments essentiels: l'ADN Polymérase III, l'anneau de processivité ou β -Clamp, et le complexe- γ ou chargeur de l'anneau de processivité (Tableau I1). La synthèse d'ADN démarre après l'assemblage du réplisome. La vitesse de celui-ci (1000 nt/s chez *E. coli*) lui permet de rattraper l'hélicase répllicative et de s'y lier; entraînant par la même occasion une stimulation de celle-ci. L'hélicase répllicative déroule dès lors le duplex d'ADN à la même vitesse que le réplisome et s'en suit une synchronie entre l'avancée de DnaB et celle du réplisome. L'hélicase répllicative DnaB coordonne ainsi son avancée à celle du réplisome.

L'enzyme responsable de la synthèse des brins, continu et discontinu, au cours de la réplication est l'ADN Polymérase III. Elle est constituée de trois sous-unités: α , ϵ et θ . La sous-unité α possède l'activité polymérase. Elle est peu rapide (8 nt/s) et peu processive (1-10 bp) (Maki et Kornberg 1985). Lui est associée, la sous-unité ϵ , responsable de l'activité exonucléase éditrice 3'-5'. Elle constitue un facteur de processivité extrêmement important. Lorsqu'elle est absente, la processivité du réplisome (>50 Kb) chute à 1,5 Kb (Studwell et O'Donnell 1990). Enfin la sous-unité θ ne présente pas de fonction majeure mis à part la légère stimulation qu'elle opère sur l'activité exonucléase de la sous-unité epsilon (Taft-Benz et Schaaper 2004).

L'anneau de processivité comme son nom l'indique est le facteur qui rend l'ADN Polymerase III extrêmement processive (>50 Kb) et très rapide

Replisome component [stoichiometry ^{b,d}]	Gene	Mol. wt. (kDa)	Function
Pol III holoenzyme ^c		791.5 ^c	Dimeric, ATP-dependent, processive polymerase/clamp loader ^c
Pol III star ^c		629.1 ^c	Dimeric polymerase/clamp loader ^c
Core ^c		166.0 ^c	Monomeric polymerase/exonuclease ^c
α [2]	<i>dnaE</i>	129.9	DNA polymerase
ε [2]	<i>dnaQ</i>	27.5	3'-5' Exonuclease
θ [2]	<i>holE</i>	8.6	Stimulates ε exonuclease
γ/τ complex ^c		297.1 ^c	ATP-dependent clamp loader ^c
γ/τ [1/2]	<i>dnaX</i>	47.5/ 71.1	ATPase, τ organizes Pol III star and binds DnaB
δ [1]	<i>holA</i>	38.7	Binds β clamp
δ' [1]	<i>holB</i>	36.9	Stator, stimulates γ ATPase in ATP site 1
χ [1]	<i>holC</i>	16.6	Binds SSB
ψ [1]	<i>holD</i>	15.2	Connects χ to clamp loader
β [2 dimers]	<i>dnaN</i>	40.6	Homodimeric processivity sliding clamp ^c

Tableau I1. L'holoenzyme ADN Polymérase III. (Johnson et O'Donnell 2005). Le tableau synthétise l'architecture de la machinerie de réplication. Les sous-unités constitutives de l'ADN polymérase III (Core) et du complexe gamma (γ/τ complex) sont listées et leur stoechiométrie dans l'holoenzyme ADN Polymérase III indiquée entre crochets. Les gènes codants pour chacune des ces sous-unités sont aussi indiqués, de même que leur masse moléculaire (kDa) et la fonction remplie (Function). L'ensemble "Core" et "γ/τ complex" surligné en gris sombre est également appelé "Pol III star". L'association "Pol III star" et β-clamp est l'holoenzyme ADN Polymérase III.

(1000 nt/s). L'ADN Polymérase Pol III, via l'extrémité C-terminal de sa sous-unité alpha, est reliée directement à l'anneau de processivité (Lopez de Saro *et al.* 2003). Cette liaison permet ainsi de stabiliser la polymérase.

La structure cristallographique de l'anneau de processivité révèle un homodimère dont la cavité centrale de diamètre $\sim 35\text{\AA}$, peut aisément accueillir un duplex d'ADN (Xong *et al.* 1992). Du fait de sa structure, l'anneau requiert également à l'image de DnaB, une déstabilisation à une de ses interfaces pour accéder à l'ADN. Cette déstabilisation est réalisée par le complexe- γ .

Le complexe- γ est composé de six différentes sous-unités définies dans la stoechiométrie suivante: $\gamma_1\tau_2\delta_1\delta'_1\chi_1\psi_1$ (Lopez de Saro *et al.* 2003). Au delà de la charge de l'anneau de processivité, le complexe- γ assure aussi la cohésion entre les différents éléments du réplisome (Figure I4). Les sous-unités γ et τ lient l'ATP et l'hydrolyse lors de la charge l'anneau de processivité; elles sont qualifiées de "moteur" du complexe. Les sous-unités τ via deux domaines C-terminaux lient l'hélicase répllicative DnaB, ce qui la stimule et lui confère une vitesse de translocation assimilable à celle du réplisome (Tsuchihashi et Kornberg 1989; Xiao *et al.* 1995); ceci permet de coordonner la vitesse de séparation de la double hélice d'ADN à celle de synthèse des brins d'ADN lors de l'avancée du réplisome. La sous-unité δ spécifie à elle seule, la charge de l'anneau de processivité. δ' et χ sont respectivement impliquées dans la cohésion entre γ et τ , et la liaison à la protéine SSB (qui se lie à l'ADN simple brin généré par DnaB au cours de son avancée, empêchant ainsi la renaturation des brins parentaux) (Figure I4). La sous-unité ψ assure la connexion du réplisome avec χ . En absence d'ATP, le complexe- γ présente une faible affinité pour l'anneau de processivité (Stewart *et al.* 2001). Lors de la liaison à l'ATP, un changement de conformation rend accessible la sous-unité δ qui se lie à l'anneau de processivité et déstabilise une des interfaces du dimère de l'anneau entraînant son ouverture (Naktinis *et al.* 1995). Le complexe qui résulte de l'association entre l'anneau de processivité et complexe- γ présente une forte affinité pour l'ADN, particulièrement pour les molécules hybrides ADN-ARN

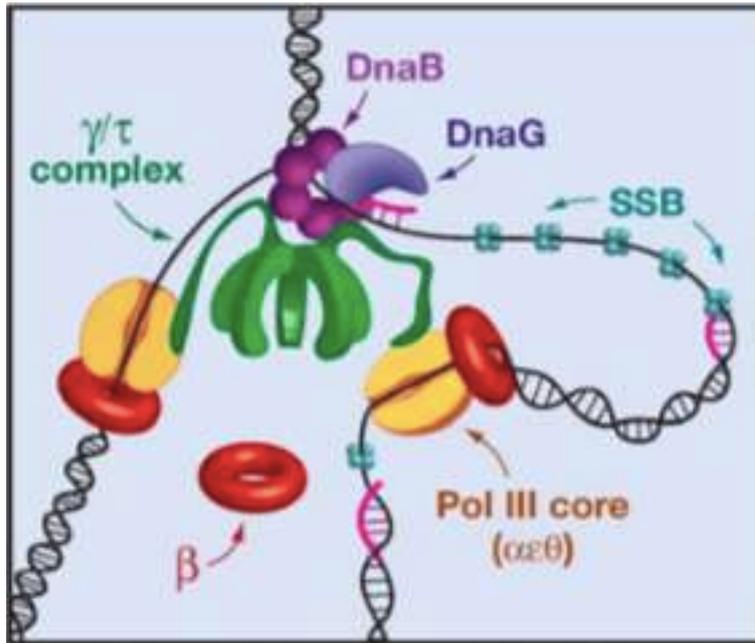


Figure I4. Organisation du réplisome. (Johnson et O'Donnell 2005). A la fourche de réplication, le complexe γ (vert) fait le pont entre l'hélicase répliquative DnaB (violet) et l'ADN polymérase III "core" (orange). Chaque ADN polymérase III est associée à un anneau de processivité (rouge). La protéine DnaG (lila) s'associe de manière distributive à l'hélicase DnaB, ce qui active la synthèse d'amorce ARN (brins roses) pour la formation des fragments d'Okasaki. La protéine SSB (vert) se fixe à la matrice du brin à réplication discontinu après le passage de l'hélicase DnaB.

générées du fait de l'activité de la primase DnaG (Johnson et O'Donnell 2005); l'ouverture de l'anneau de processivité générée après son association avec le complexe- γ permet son accessibilité aux molécules hybrides ADN:ARN et l'hydrolyse de l'ATP précédemment liée au complexe- γ s'ensuit pour permettre la fermeture de l'anneau de processivité sur les hybrides ADN-ARN. Une fois l'anneau de processivité refermé, le complexe- γ se dissocie et est recyclé pour la synthèse des fragments d'Okasaki.

Régulation de l'initiation de la réplication chez *E. coli*

Chez *E. coli*, trois mécanismes majeurs contrôlent le démarrage de la réplication. Le premier impacte directement la disponibilité de l'origine de réplication *oriC* et consiste en sa « séquestration » qui empêche *a fortiori* l'accès de la protéine initiateur de la réplication, DnaA, à l'origine. La protéine SeqA en est responsable (Lu *et al.* 1994). De manière sous-jacente, la protéine SeqA séquestre également le promoteur du gène *dnaA* inhibant ainsi sa transcription ; elle possède en ce sens également la capacité de contrôler le pool protéique de l'initiateur de la réplication. Le deuxième mécanisme appelée RIDA (Regulatory Inactivation of DnaA) consiste à inactiver la forme active de la protéine DnaA (DnaA-ATP) présente à *oriC*, par hydrolyse de l'ATP qui lui est associée. Ce mécanisme est dépendant de la protéine Hda et fait intervenir l'anneau de processivité (Katayama *et al.* 1998 ; Su'etsugu *et al.* 2008). Le troisième mécanisme quant à lui, consiste à titrer, d'une part le pool actif de la protéine DnaA à travers différents sites, de faible et forte affinités répartis sur le génome, le locus génomique *datA* (Skarstad et Katayama 2013) est l'un de ces sites, d'autre part à titrer le pool inactif de la protéine DnaA présent dans la cellule (DnaA-ADP) et à le régénérer afin de reconstituer un potentiel d'initiation (Figure I5). Cette régénération est assurée par des régions chromosomiques nommées DARS1 et DARS2 (DnaA-Reactivating Sequence) (Figure I5).

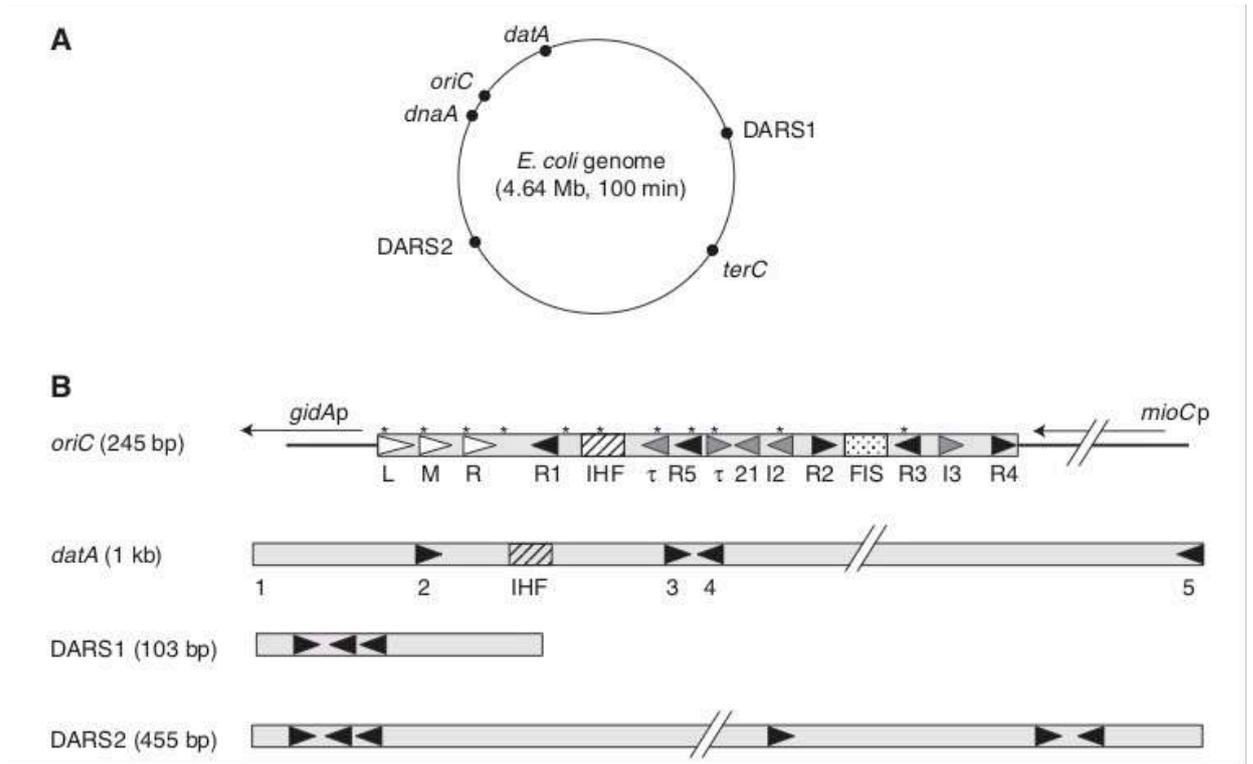


Figure I5. Les éléments de régulation de l'initiation de la réplication. (Skarstad et Katayama 2013). **A.** La localisation des loci *OriC*, *datA*, *dnaA*, DARS1 et DARS2 est indiquée sur le chromosome de *E. coli*. Le terminus de la réplication est indiqué par le locus *terC*. **B.** Les motifs de régulation présents au niveau de ces locus sont indiqués (triangles et rectangles).

- La séquestration d'*oriC*

La séquestration d'*oriC* se fait via la protéine SeqA qui se lie aux origines de réplication nouvellement dupliquées (Lu *et al.* 1994). SeqA discrimine entre les anciennes et nouvelles origines grâce à l'état de méthylation des séquences GATC présentes au locus *oriC*. Les adénines de ces séquences sont reconnues et méthylées par la méthylase Dam (Geier *et al.* 1992). Après le passage de la fourche de réplication, les adénines des brins néosynthétisés ne sont pas méthylées ; les séquences chromosomiques GATC demeurent donc hémiméthylés environ une minute après le passage de la fourche de réplication. Cependant, la fréquence élevée des séquences GATC à l'origine de réplication conduit à une hémiméthylation de *oriC* pendant 1/3 du temps de génération, environ 10 minutes (Campbell et Kleckner 1990). Durant ce temps, les origines restent séquestrées par SeqA et de nouvelles initiations ne peuvent se faire. Il est également proposé que la liaison de SeqA altère la superhélicité de l'ADN et inhibe la formation du complexe ouvert en empêchant la protéine DnaA-ATP de se lier aux sites de faible affinités présents à l'origine (Torheim et Skarstad 1999 ; Nievera *et al.* 2006). De manière analogue, SeqA se lie au promoteur du gène *dnaA* lors de la réplication pour à peu près la même durée qu'à l'origine de réplication ; La transcription du gène *dnaA* est ainsi bloquée (Campbell et Kleckner 1990). La protéine DnaA n'est plus produite et le potentiel d'initiation est contrôlé.

- Le mécanisme RIDA

Lorsque la forme active de la protéine DnaA a été utilisée pour promouvoir l'initiation de la réplication, la molécule d'ATP qui lui est liée est hydrolysée par un complexe complexe bi-partite contenant la protéine Hda liée à l'ADP (Hda-ADP) et l'anneau de processivité. La forme DnaA-ADP qui en résulte est inactive: C'est le RIDA (Kato et Katayama 2001; Su'etsugu *et al.* 2001). Le gène *hda* est requis pour le control de la prolifération cellulaire, la diminution de DnaA-ATP dans la cellule et bloque les phénomènes de sur-initiation de la réplication; l'incubation à température restrictive d'un mutant thermosensible pour la protéine Hda conduit à de la sur-initiation de la réplication. La protéine Hda possède une courte région amino-terminale

contenant son motif de liaison à l'anneau de processivité (Kato et Katayama 2001; Dalrymple *et al.* 2001). En fin de synthèse des fragments d'Okasaki à l'origine de réplication, l'ADN Polymérase III est dissocié de l'anneau de processivité et celui-ci demeure associé au brin néo-synthétisé. La protéine Hda-ADP se lie alors à la poche hydrophobique du facteur de processivité via son motif de liaison en N-terminal; le complexe qui en résulte interagit avec la forme DnaA-ATP et promeut l'hydrolyse de l'ATP qui rend la protéine DnaA inactive (Su'etsugu *et al.* 2005). Le complexe Hda: β -Clamp est stable; plusieurs cycles d'hydrolyse de l'ATP sont donc engagés après l'initiation de la réplication et le pool de DnaA-ATP ainsi contrôlé.

- Titration de DnaA-ATP et régénération

Au-delà de son rôle de protéine initiatrice de la réplication, DnaA joue également le rôle de régulateur transcriptionnel. Il existe environ 300 sites de forte affinités pour la protéine DnaA répartis sur le chromosome de *E. coli* (Skarstad et Katayama 2013). Lorsque le chromosome d'*E. coli* est en cours de réplication, ces sites de liaison sont dupliqués et contribuent à titrer DnaA en dehors de l'origine de réplication. Le plus remarquable de ces sites est le locus génomique *datA* situé près d'*oriC* et dupliqué juste après l'initiation de la réplication (Figure I5) (Kitagawa *et al.* 1996; Kitagawa *et al.* 1998; Ogawa *et al.* 2002). Une étude *in vitro* montre qu'un seul plasmide porteur de la séquence *datA* titre 370 molécules de DnaA; ce qui représente environ 60% du pool protéique de DnaA présent dans la cellule (Kitagawa *et al.* 1996). *In vivo* par contre, le locus *datA* titre en moyenne 60 molécules (Hansen *et al.* 2007). Le locus *datA* mesure 1 kilo-paires de bases (kbp) et contient cinq sites de fortes affinités (boîtes DnaA) et vingt-cinq de faibles affinités pour la forme active de la protéine DnaA (Ogawa *et al.* 2002).

E. coli est aussi capable de convertir la forme DnaA-ADP en DnaA-ATP. Les séquences DARS1 et DARS2 situées à mi-chemin, respectivement au niveau des réplichores droit et gauche entre *oriC* et *TerC* promeuvent cette conversion. Elles contiennent chacune trois boîtes DnaA orientées de la même manière (Figure I5). Des monomères de DnaA liés à l'ADP sont

capables de former des oligomères sur les boîtes DnaA des séquences DARS (Kurokawa *et al.* 1999) Plusieurs molécules de DnaA-ADP peuvent donc se complexer aux loci DARS dans un état oligomérique; cette liaison facilite le relargage de l'ADP et les monomères natifs de DnaA qui en résultent, déstabilisés par l'absence de nucléotides, sont libérés des séquences DARS. Ces molécules de DnaA sont à nouveau capables de lier l'ATP et sont recyclées.

Le redémarrage des fourches de réplication

La réplication du chromosome est loin d'être un processus sans encombre. Le réplisome peut se bloquer, s'arrêter et/ou se disloquer (ses composants se dissocient les uns des autres ainsi que de l'ADN) du fait essentiellement de dommages inhérents à la molécule d'ADN (Figure I6), de cassures simples brins présentes sur les brins matrices, ou encore du fait de la collision de la machinerie de réplication avec des protéines fixées à l'ADN qui inhibent son avancée au cours de la réplication; la rencontre du réplisome avec l'ARN polymérase bloquée en plein processus de transcription est un exemple. Dans ces situations, le redémarrage de la réplication nécessite un traitement de l'obstacle qui consiste, soit au contournement du dommage de la molécule d'ADN par réversion de la fourche (Figure I7), soit à l'utilisation du système Recombinaison-Réplication lorsque la dislocation de la fourche génère *a fortiori* des cassures doubles brins sur la molécule d'ADN en cours de réplication (Figure I8).

Ces opérations conduisent à la formation de structures fourchues à « trois ou quatre brins » (Figure I9) reconnues comme substrats par les protéines du primosome PriA ou PriC (Heller et Marians 2006 ; Michel *et al.* 2018). A la suite de cette reconnaissance, l'hélicase répllicative DnaB est rechargée sur la molécule d'ADN en association avec DnaC et la protéine DnaT. Le réassemblage de la machinerie de réplication suit et la réplication redémarre.

- Quelques causes d'arrêt et/ou de dislocation du réplisome

La molécule d'ADN n'est pas une substance inerte telle qu'on pourrait la concevoir en considérant la grande stabilité des génomes. L'environnement dans lequel baignent les cellules, la présence éventuelle de substances toxiques, l'exposition aux ultra-violets (UV) ou à des radiations ionisantes les soumet à de nombreuses agressions chimiques pouvant modifier les bases azotées ou altérer les squelettes sucre-phosphate. Par exemple, les dimères de thymine issus de la formation d'un cycle cyclobutyle entre deux thymines, provoquée par l'irradiation des UV de 200-300 nm ou encore la formation de résidus méthylés tel que le 3-méthyladénine, 7-méthylguanine par la S-adénosylméthionine, une molécule normale du métabolisme, sont des exemples de dommages naturellement inhérent à la molécule d'ADN (Lindahl 1993) (Figure I6). Ces dommages déforment localement la double hélice d'ADN, de telle façon qu'elle ne peut plus servir de matrice adéquate à la réplication ; la transcription est de la même manière arrêtée. Le réplisome est ainsi arrêté et peut ensuite se disloquer.

Entre autres, la rencontre des fourches de réplication avec des cassures simples brins présentes sur les brins matrices, conduit également à une dislocation. Ces cassures simples brins surviennent lors d'un défaut d'incorporation par L'ADN Polymerase III de nucléotide au cours de la réplication. L'ADN Polymerase III sélectionne les bases pour les incorporer dans l'ADN essentiellement en fonction de leur capacité d'appariement avec la base présentée sur le brin matrice. Par exemple, elle incorpore parfois une désoxyuridylylate (dUTP) à la place d'une désoxythymidilate (dTTP) malgré la faible quantité de dUTP présente dans la cellule. Ces urydilates sont remplacées via la réparation par excision de base (BER : Base Excision Repair). Cependant comme l'excision se produit plus vite que le remplacement de la base inadéquate, les ADN récemment synthétisés deviennent fragmentés. Lorsque la fourche de réplication arrive à hauteur de telles cassures présentes par exemple sur le brin matrice servant à la synthèse du brin continu, une cassure double brin est générée et la fourche de réplication se disloque (Figure I8).

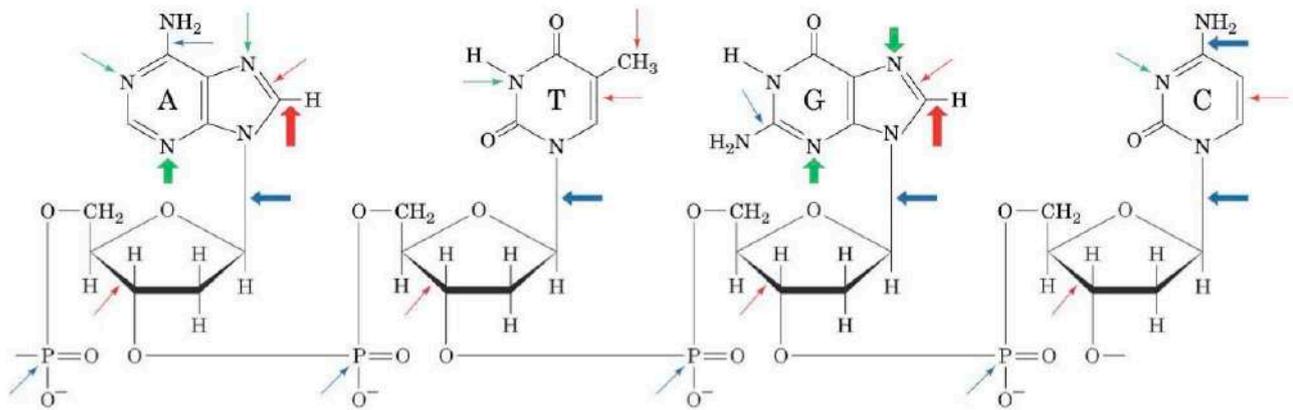


Figure I6. Les différents types d'altérations chimiques possibles *in vivo* et leurs positions. (Lindahl 1993). Les flèches rouges indiquent les sites sujets à une attaque oxydative, les flèches bleues à une hydrolyse spontanée et les flèches vertes indiquent les sites sujets à une méthylation non enzymatique par la S-adénosyméthionine. L'épaisseur d'une flèche indique la fréquence relative de la réaction. (Schéma tiré de D. Voet & J. G. Voet, *Biochimie*. 2^e édition)

Les cassures doubles brins sont reconnues par les protéines RecBCD qui initient la recombinaison, ce qui génère la formation d'une D-Loop (Figure I8) reconnue par la protéine PriA comme substrat fourchue. Cette reconnaissance conduit au réassemblage du réplisome et la réplication repart : C'est le processus de Recombinaison-réplication.

- Traitement des réplisomes disloqués

Lorsque des dommages à l'ADN bloquent le réplisome, ceux-ci peuvent être contournés par réversion des fourches de réplication (Figure I7). La réplication de l'ADN s'arrête au site où le blocage à l'ADN survient mais se poursuit sur l'autre brin qui n'est pas endommagé, sur une certaine distance avant que le réplisome ne se disloque. La fourche de réplication est ensuite réversée par réappariement des brins matrices. Cette réversion peut se faire soit spontanément, soit être provoquée par le super-enroulement qui s'est constitué à l'avant de la fourche ou encore résulter de l'action de la protéine RecA (Figure I7) (McGlynn 2011; Cox 2000).

Lors d'une dislocation de la fourche de réplication par rencontre d'une cassure simple brin et génération d'une cassure double brin (Figure I8), le système de recombinaison RecBCD et RecA permet à l'extrémité 3' du brin néo-synthétisé et non endommagé d'être envahi par l'ADN complémentaire de la molécule homologue double brin (Figure I8) (Cox 2000). La migration du brin envahisseur par RuvAB produit alors une structure de Holliday résolue par RuvC qui permet la reconstitution de la fourche de réplication prête à redémarrer. (Figure I8) (Cox 2000).

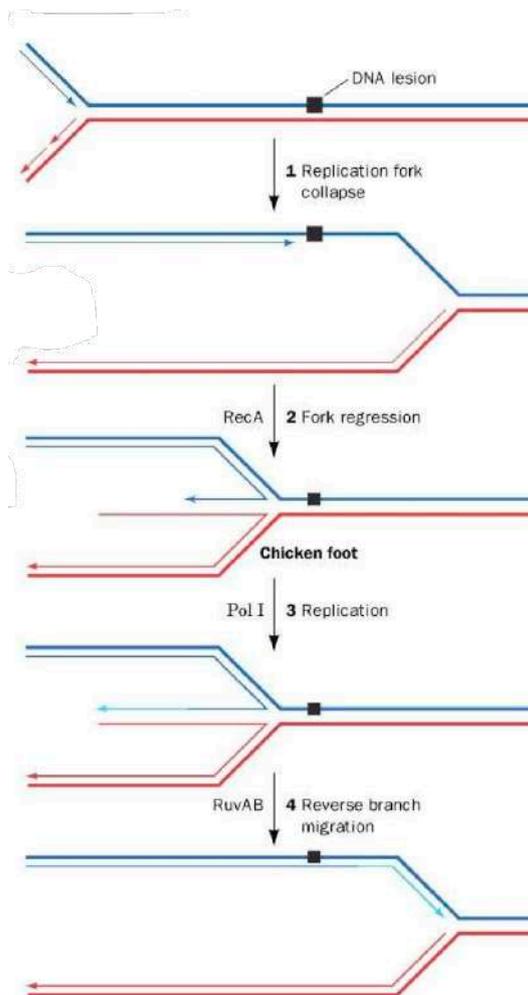


Figure 17. Contournement d'une lésion par réversion de fourche. Le dommage à l'ADN représenté par le carré noir bloque l'élongation du brin avancé (trait fin bleu); celle du brin retardé (trait fin rouge) continue sur quelques paires de base avant la dislocation du réplisome. La brèche simple brin de la matrice du brin à réplication avancée est reconnue par la protéine RecA qui catalyse le réappariement des brins matrices, entraînant de manière concomitante un appariement des brins néosynthétisés : c'est la réversion de fourche. L'élongation du brin avancé reprend par l'intermédiaire de l'ADN polymérase I qui utilise pour matrice le brin néosynthétisé retardé ; la structure à quatre branches qui résulte de la réversion est assimilable à un intermédiaire de Holliday reconnue par le complexe RuvABC qui catalyse la migration de branche. Celle-ci conduit à une restauration de la fourche initiale reconnue *in fine* par les protéines du primosome qui amorcent la formation d'un nouveau réplisome (**Schéma tiré de D. Voet & J. G. Voet, Biochimie. 2^e édition**)

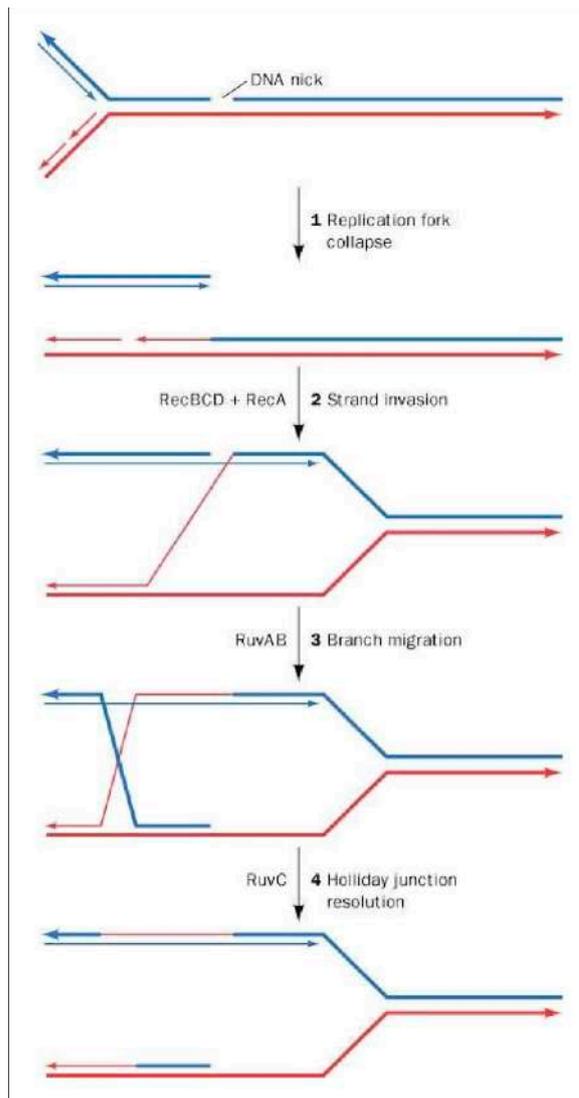


Figure I8. La recombinaison-réplication. La rencontre d'une cassure simple brin présent dans la matrice par le réplisome génère une cassure double brin. Celle-ci est reconnue par le complexe de recombinaison RecBCD qui génère par son activité endonucléase, un substrat ADN simple brin reconnu ensuite par la protéine RecA. La protéine RecA permet l'invasion du duplex intacte par l'extrémité 3' du substrat ADN simple brin généré par RecBCD et conduit à la formation d'une D-Loop. La migration de l'invasion par le complexe RuvAB forme une jonction d'Holliday résolue par RuvC. La fourche de réplication est ainsi reconstituée, reconnue par les protéines du primosome et le redémarrage de la réplication s'ensuit. **(Schéma tiré de D. Voet & J. G. Voet, Biochimie. 2^e édition)**

- Formation du primosome

Le primosome est le système de reconnaissance spécifique des sites de redémarrage de la réplication et l'intermédiaire qui permet la formation d'un nouveau réplisome à ces sites. Les protéines du primosome, au contraire de l'initiateur de la réplication DnaA – qui reconnaît des séquences spécifiques présentes au locus *oriC* - reconnaissent des éléments structuraux de l'ADN (Figure I9). Les protéines PriA et PriC spécifient deux voies distinctes qui convergent vers la charge d'une nouvelle molécule d'hélicase DnaB ; ce qui permet la reformation d'un réplisome actif (McGlynn 2011 ; Heller et Marians 2006).

La protéine PriA est une hélicase dimérique qui possède la capacité de reconnaître avec une forte affinité les structures fourchues de l'ADN tel que les fourches de réplication et les intermédiaires de recombinaison D-Loop (Hall et Matson, 1999 ; McGlynn *et al.* 1997 ; Nurse *et al.* 1999). La proximité de l'extrémité 3'-OH du brin continu au point de jonction de la fourche est cruciale dans la reconnaissance par PriA. Lorsque la distance entre le point de jonction et l'extrémité 3'OH dépasse cinq nucléotides, l'affinité de PriA pour la fourche décroît ; de même que sa capacité à promouvoir la formation du réplisome (Heller et Marians 2006). L'interaction PriA-ADN induit la liaison de PriB qui stabilise le complexe PriA-ADN et facilite la fixation de DnaT. Le complexe multi-protéique PriA-PriB-DnaT-ADN est ensuite compétent pour la charge de l'hélicase DnaB en complexe avec DnaC. Une fois DnaB chargée les autres composants du réplisome peuvent se réassocier et la réplication peut redémarrer (McGlynn 2011 ; Heller et Marians 2006) (Figure I9).

La seconde voie alternative de formation du primosome est la voie PriC-dépendante. Les évidences de l'implication de PriC comme composant alternatif pour la formation du primosome proviennent d'analyses génétiques. Dans les cellules PriC sauvages, les doubles mutations *priA priB* dans la cellule s'avèrent plus délétères que la simple mutation *priA* dans la cellule, ce qui indique une redondance fonctionnelle entre PriB et PriC. En outre, on observe une létalité synthétique entre les mutations *priA* et *priC*

(Sandler *et al.* 1999). Ces observations soulignent le rôle de PriC dans une voie autre que celle PriA-dépendante. Contrairement à PriA, la protéine PriC est inhibée par la proximité directe de l'extrémité 3'OH avec le point de jonction de la fourche ; une distance d'au moins sept nucléotides est requise pour une activité optimale.

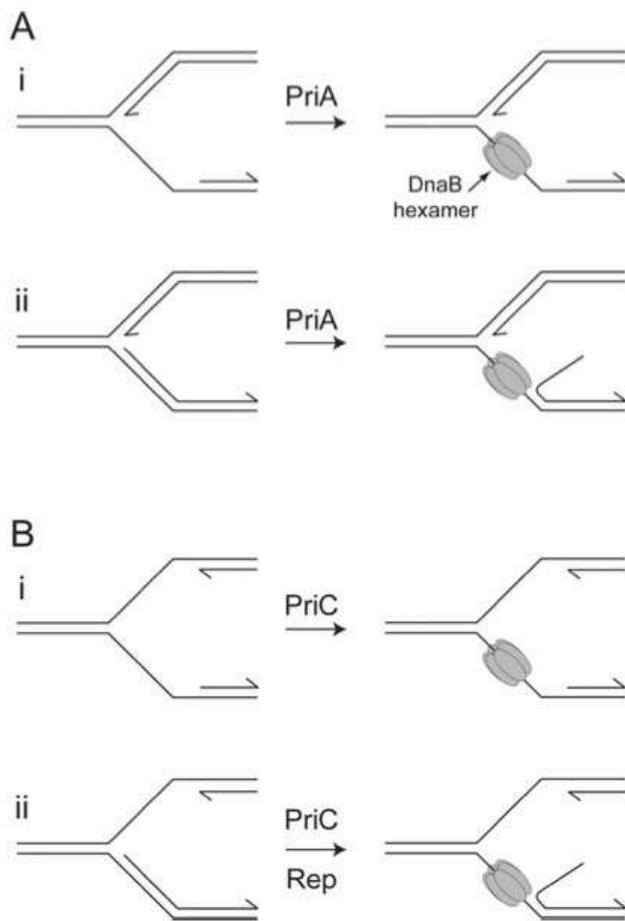


Figure 19. Mécanismes d'assemblage du réplisome chez *E. coli* lors du redémarrage des fourches. **A.** L'hélicase PriA se lie préférentiellement aux structures fourchées qui possèdent l'extrémité 3' du brin avancé proche du point de jonction entre les brins matrices de la réplication (i et ii). La reconnaissance par PriA de cette extrémité conduit ensuite à la charge d'une nouvelle molécule de DnaB sur la matrice du brin à réplication retardée lorsque celle-ci est sous forme simple brin (i). Dans ce cas l'activité hélicase de PriA n'est pas requise. Par contre lorsque la matrice du brin à réplication retardée est apparié (ii) l'activité hélicase de PriA sépare les brins pour générer un substrat simple brin propice à la charge de l'hélicase DnaB. **B.** La protéine PriC qui définit la seconde voie de redémarrage de la réplication, se lie quant à elle à des structures fourchées, dépourvues d'extrémité 3' du brin avancé proche du point de jonction de la fourche. Lorsque la matrice du brin retardée est sous forme simple brin (i) PriC catalyse la charge de l'hélicase répllicative ; dans le cas contraire (ii), la protéine Rep sépare les brins appariés pour permettre la charge de l'hélicase.

Chapitre 2. Les hélicases de la réplication

Les hélicases réplicatives

Nous entendons par hélicase réplicative, les hélicases qui se chargent de dérouler les deux brins de la molécule d'ADN afin de permettre l'avancée du réplisome et ainsi permettent la duplication du génome. Je focalise dans les lignes qui suivent sur les hélicases réplicatives hexamériques car leur conformation (en anneau) pose la question de leur accessibilité à l'ADN ; ce problème est résolu dans certains systèmes par l'intervention de facteurs connus sous le nom de chargeur d'hélicase. Dans d'autres systèmes, ces chargeurs sont inexistantes et les hélicases peuvent se charger d'elles-mêmes sur l'ADN.

Deux familles d'hélicases hexamériques réplicatives sont bien connues : la famille de type-DnaB qui regroupe les hélicases codées par les génomes procaryotes (bactérien, plasmidique et bactériophagique) et la famille de type-MCM (Mini Chromosomes Maintenance) constituée d'hélicases codées par les génomes eucaryotes et archa (Singleton *et al.* 2007 ; Bailey *et al.* 2007 ; Berger, 2008 ; Wang *et al.* 2008 ; Strycharska *et al.* 2013).

- Les hélicases réplicatives de type-DnaB

Globalement, les hélicases de type-DnaB sont des homo-hexamères de polarité 5'-3'. Chaque monomère constitutif de l'hexamère se replie en deux domaines globulaires, N-terminal et C-terminal relié par une hélice (« Linker helix ») (Figure I10A). Les domaines N-terminaux s'assemblent deux à deux et forment un trimère de dimères (Figure I10B) ; ils ébauchent un premier palier dans la structure quaternaire des hélicases de type-DnaB. Les domaines C-terminaux s'assemblent en un cycle de quasi symétrie d'ordre 6 qui constitue le second palier (Figure I10) (Bailey *et al.* 2007 ; Wang *et al.* 2008 ; Strycharska *et al.* 2013).

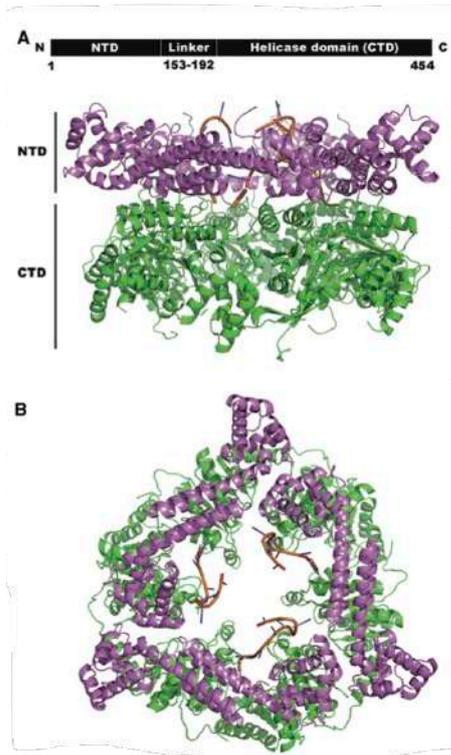


Figure I10. Organisation d'une hélicase répliquative hexamérique de type-DnaB. (Lo *et al.* 2009). A. La structure primaire d'une sous-unité de l'hélicase de *Geobacillus Kaustophilus* est présentée ici avec ses extrémité N-terminale (N) et C-terminale (C). Les domaines N- et C- terminaux (NTD et CTD) sont entrecoupés par l'hélice de liaison ("Linker helice"). La structure quaternaire de l'homo-hexamère s'organise en 2 paliers N-terminal (violet) et C-terminal (vert). B. Les domaines N-terminaux s'assemblent deux à deux ; les dimères formés se rassemblent à leur tour en trimère.

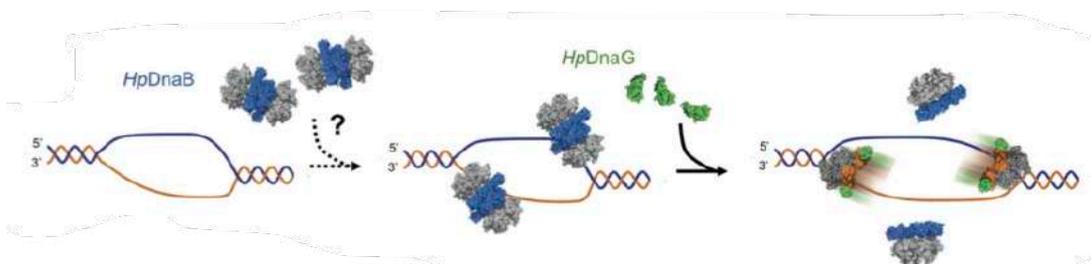


Figure I11. Modèle proposé dans (Bazin *et al.* 2015) pour la charge et l'activation de l'hélicase répliquative de *H. pylori*.

➤ Chez les bactéries

DnaB est le nom générique donné aux hélicases répliquatives bactériennes en s'inspirant du modèle *E. coli* chez les entérobactériales. Chez *Bacillus subtilis*, l'hélicase répliquative est appelée DnaC et cause la confusion avec le chargeur d'hélicase DnaC présent chez *E. coli*. Deux groupes témoignent de la diversité de gestion de l'hélicase répliquative pour son accessibilité à l'ADN. Le premier dépend de facteurs nommés chargeurs d'hélicases à l'image de DnaC chez *E. coli* ou DnaI chez *B. subtilis*. Le second groupe ne possède pas les chargeurs d'hélicase DnaC ou DnaI (DnaC/I) et semble indépendant de tous autres facteurs aidant à la charge de l'hélicase répliquative; les hélicases répliquatives de *Helicobacter Pylori*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Pseudomonas putida* sont des exemples.

Chez *E. coli*, l'hélicase répliquative DnaB adopte une conformation fermée et plane en solution. Le chargeur DnaC en se liant à DnaB contraint la conformation fermée et plane de DnaB, majoritaire en solution, en une conformation qui rompt le point de contact entre deux de ses sous-unités (Arias-Palomo et al. 2013). La conformation fermée et plane de l'hexamère est alors rompue et l'hélicase répliquative peut accéder à des molécules ADN simples brins comme celles générées lors de la formation du complexe ouvert. Ce mécanisme est nommé "Ring-breaker" (Arias-Palomo et al. 2013).

Chez *B. subtilis*, l'hexamère préformé en solution de l'hélicase répliquative (DnaC) est inactif (Velten et al. 2003). En conditions où des monomères de l'hélicase répliquative sont présents de manière concomitante avec le chargeur DnaI, l'hélicase répliquative DnaC devient active. Il apparaît que DnaI assemble les sous-unités de l'hélicase autour d'une molécule simple brin d'ADN pour une conformation compétente à son activité (Velten et al. 2003). Ce mécanisme est qualifié de "Ring-maker". Les détails atomiques de ce mécanisme ne sont pour l'instant pas encore définis.

Le cas de l'hélicase répliquative de *Helicobacter pylori* est extrêmement intéressant. Cette hélicase complémente un mutant thermosensible du chargeur d'hélicase (*dnaCts*) d'*Escherichia coli* à température non permissive ; un double mutant (*dnaB252 dnaCts*) thermosensible à la fois pour l'hélicase répliquative DnaB et le chargeur d'hélicase DnaC, est aussi complétement en présence de l'hélicase de *H. pylori*. Ce qui entre en accord, *in vitro*, avec la capacité de l'hélicase à se charger seule et s'activer sans aucun autre facteur additionnel (Soni *et al.* 2003 ; Soni *et al.* 2005).

La structure cristallographique de l'hélicase de *H. pylori* présente un dodécamère constitué de deux hexamères accolés via leurs domaines N-terminaux et est défini comme étant la forme majoritaire en solution en équilibre avec une forme simple hexamérique (Bazin *et al.* 2015). Le dodécamère d'hélicase est inactif (Bazin *et al.* 2015) ; l'association de la primase DnaG de *H. pylori* avec celui-ci entraîne sa dissociation en simples hexamères actifs (Bazin *et al.* 2015). Il est par ailleurs établi que seule la forme dodécamérique présente de l'affinité pour l'ADN simple brin (Bazin *et al.* 2015). Il a donc été proposé, *in vivo*, qu'après la formation du complexe ouvert, que la forme dodécamérique reconnaisse les simples brins ADN générés et s'y charge sans facteur additionnel ou avec un facteur encore non déterminé propre à *H. pylori* ; la liaison ultérieure de la primase avec le dodécamère le dissocierait ensuite en hexamères actifs pour la séparation des brins de la molécule d'ADN (Bazin *et al.* 2015) (Figure I11).

L'étude des prérequis au maintien de la stabilité du plasmide à large spectre, RK2, montre également la diversité de fonctionnement des hélicases répliquatives bactériennes. *In vitro*, les hélicases purifiées de *P. aeruginosa* et *P. putida* contrairement à l'hélicase de *E. coli* sont chargées et activées en l'absence de tout facteur relatif à DnaC/I à l'origine de répllication (*oriV*) du plasmide RK2 (Caspi R *et al.* 2001; Jiang Y *et al.* 2003; Konieczny 2003).

Le plasmide RK2 code sa propre protéine initiatrice de la répllication (TrfA) qui présente deux isoformes, TrfA-33 et TrfA-44, obtenus par décalage de cadre de lecture. *In vitro*, les deux isoformes interviennent en association

avec DnaA et DnaC pour la charge de l'hélicase répliquative d'*E. coli* (Jiang Y *et al.* 2003).

En utilisant l'hélicase répliquative de *P. putida* (présentant 60% d'identité de résidus avec celle de *E. coli*), l'isoforme TrfA-44 est suffisante à elle seule pour la charge de l'hélicase répliquative de *P. putida* et lorsque l'isoforme TrfA-33 est utilisé, il ne requiert que la protéine DnaA pour la charge de l'hélicase (Caspi R *et al.* 2001). Avec l'hélicase de *P. aeruginosa* (présentant 85% et 61% d'identité de résidus, respectivement avec les hélicases de *P. putida* et *E. coli*), seule l'isoforme TrfA-44 est fonctionnelle et suffit pour la charge de l'hélicase; TrfA-33 est non fonctionnelle pour la charge de l'hélicase de *P. aeruginosa* (Caspi R *et al.* 2001; Jiang Y *et al.* 2003).

➤ Chez les plasmides

Il existe trois modes de répliquation chez les plasmides : la répliquation thêta, la répliquation « Strand Displacement » et la répliquation « Rolling-circle ».

La répliquation selon le mode thêta a été essentiellement étudiée chez les Gram négatifs avec *E. coli* pour organisme modèle. Dans ce contexte, la charge de l'hélicase répliquative DnaB est toujours dépendante de DnaC (Lilly et Camps 2015 ; del Solar *et al.* 1998). Deux voies différentes présentées ci-dessous conduisent à son recrutement et sa charge au niveau de l'origine de répliquation (Lilly et Camps 2015).

Les plasmides à répliquation Strand Displacement, hautement intéressants codent leur propre hélicase; RepA, hexamérique, en anneau et de type-DnaB. Celle-ci ne requiert aucun facteur pour sa charge et s'assemble d'elle-même en anneau autour de l'ADN (Lilly et Camps 2015 ; del Solar *et al.* 1998).

La répliquation rolling-circle, essentiellement trouvée chez les bactéries Gram positives, utilise l'hélicase PcrA. Cette hélicase est dimérique et ne sera donc pas présentée dans les lignes qui suivent (Ruiz-Maso JA *et al.* 2015).

- La réplication Thêta

Deux voies différentes conduisent à la charge de l'hélicase DnaB aux origines de réplication des plasmides répliquant par ce mode ; la voie DnaA-dépendante et la voie PriA-dépendante (Lilly et Camps 2015 ; del Solar *et al.* 1998). Dans la réplication Thêta, selon le type de plasmide, l'ouverture de la double hélice d'ADN qui marque l'initiation est soit dépendante de la transcription, soit d'une protéine de nom générique Rep codée par le plasmide et qui représente à l'image de DnaA pour le chromosome bactérien, l'initiateur spécifique de la réplication dudit plasmide. L'assemblage du réplisome est ensuite dépendant de la protéine DnaA de l'hôte ou de la protéine PriA aussi propre à l'hôte.

Les réplicons dont l'ouverture est dépendante de protéines initiatrices nommées Rep, conduisent à la charge de l'hélicase répliquative DnaB selon la voie dépendante de DnaA et toujours en association avec le chargeur d'hélicase DnaC de l'hôte. C'est le cas par exemple des plasmides appartenant à la classe A de la réplication Thêta. Ceux-ci incluent les plasmides R1, pSC101, pPS10, P1 avec pour initiateur la protéine de nom générique RepA, le plasmide RK1 et son initiateur Trf1 puis le plasmide R6K et son initiateur π . Des boîtes DnaA sont présentes au niveau des origines de réplication de ces plasmides ; la protéine DnaA en s'y fixant aide à la courbure et à l'ouverture de l'origine en association avec les protéines initiatrices spécifiques à chacun de ces plasmides. Le complexe DnaB:DnaC est ensuite recruté à l'origine et l'hélicase répliquative est chargée sur l'ADN (Lilly et Camps 2015 ; del Solar *et al.* 1998).

Pour les plasmides dont l'ouverture de la double hélice d'ADN est dépendante de la transcription, le transcrit en lui-même sert d'amorce pour la synthèse du brin avancé créant ainsi la formation d'une boucle appelée « R-loop » générée par la séparation des brins de la molécule d'ADN parentale lorsque l'extension de l'amorce se produit. Dans ce cas, l'initiateur de la formation du réplisome, PriA, est recruté au niveau de la structure

fourchue résultant de la boucle R-loop (Masai H et Arai K. 1996). La protéine PriA via son activité hélicase promeut alors le déroulement du brin matrice à réplication retardée ; recrute ensuite les protéines PriB et DnaT du primosome qui permettent la charge de l'hélicase DnaB également en complexe avec le chargeur d'hélicase DnaC. Les plasmides qui répondent à ce mode d'initiation sont ceux de la classe B de la réplication Thêta dont ColE1 et ses dérivés. Les autres composants du réplisome se réunissent après la charge de l'hélicase et l'élongation de la réplication s'ensuit.

- La réplication « Strand Displacement » : l'hélicase RepA

Les plasmides qui répliquent en utilisant ce mode incluent ceux du groupe d'incompatibilité Q (IncQ) d'*Escherichia coli* tel que le plasmide RSF1010, R1162 et R300B (Sakai et Komano 1996).

L'hélicase RepA codée par le plasmide RSF1010 est la mieux étudiée structuralement (Sherzinger *et al.* 1997 ; Niedenzu *et al.* 2001). RepA est un homo-hexamère de polarité 5' vers 3' et son activité hélicase comme celle de DnaB est dépendante du magnésium et de l'ATP (Sherzinger *et al.* 1997 ; Niedenzu *et al.* 2001).

Après ouverture de la double hélice par RepC, l'initiateur spécifique de RSF1010, des monomères de RepA s'assemblent autour des simples brins d'ADN générés lors de l'ouverture de la double hélice et catalysent la séparation des brins parentaux de manière bidirectionnelle. Cette séparation conduit à l'exposition de deux sites d'amorçage simple brin, (ssi : single strand initiation) adjacents et tous deux palindromiques. Dans cette configuration, la complémentarité entre paires de bases des sites ssiA et ssiB favorise la formation de deux épingles à cheveux (une par brin parental). La primase RepB codée par RSF1010, reconnaît ces structures et démarre la synthèse d'amorces ultérieurement étendues par l'ADN polymérase III. L'initiation par la primase peut se faire indépendamment à l'une ou l'autre

des ssi et l'élongation des amorces est continue (Figure I12). La ligation des brins conduit ensuite à la formation de deux nouvelles molécules.

Contrairement à la réplication de type thêta, l'initiation de la réplication « strand displacement » est indépendante des facteurs de l'hôte. Ce mode de réplication autonome confère donc à ces plasmides une large variété d'hôtes.

➤ Chez les phages

Chez les coliphages, deux systèmes de réplication représentatifs des phages polyédriques et tempérés respectivement ϕ X174 et λ font intervenir l'hélicase bactérienne DnaB pour leur réplication et seront présentés. Les phages T7 et T4 dont le système de réplication est très bien étudié codent leur propre hélicase réplivative (Kornberg et Baker 1992). La réplication (*in vitro*) du phage filamenteux M13 ne dépend pas de DnaB. *In vivo* cependant dans un mutant thermosensible de DnaB, la réplication est avortée suggérant un rôle indirect de DnaB (Kornberg A et Baker T 1992 ; Olsen et al. 1972). La charge de l'hélicase DnaB dans l'initiation de la réplication de ϕ X174 est dépendante de DnaC. Chez le phage Lambda, la protéine lambda P se substitue à DnaC, recrute et charge DnaB pour la réplication de son génome.

▪ Le phage ϕ X174

Le phage ϕ X174 possède un ADN circulaire simple brin de 5386 nucléotides qui représente son brin viral (brin+). La conversion de la forme virale en forme réplivative (double brin) se fait via les protéines du primosome (Arai K et al. 1981 ; McMacken et al. 1977). Lors de l'entrée du brin viral dans la cellule, celui-ci est immédiatement recouvert de SSB sauf un segment replié en épingle à cheveux nommé PAS (Primosome Assembly Site). Cette structure est reconnue par les protéines du primosome PriA, PriB, PriC. Leur liaison entraîne la déstabilisation de quelques molécules de SSB et permet le recrutement ultérieur de la protéine DnaB en complexe avec son chargeur DnaC sur la portion simple brin générée. Le recrutement du complexe DnaB-DnaC semble médié par la protéine DnaT.

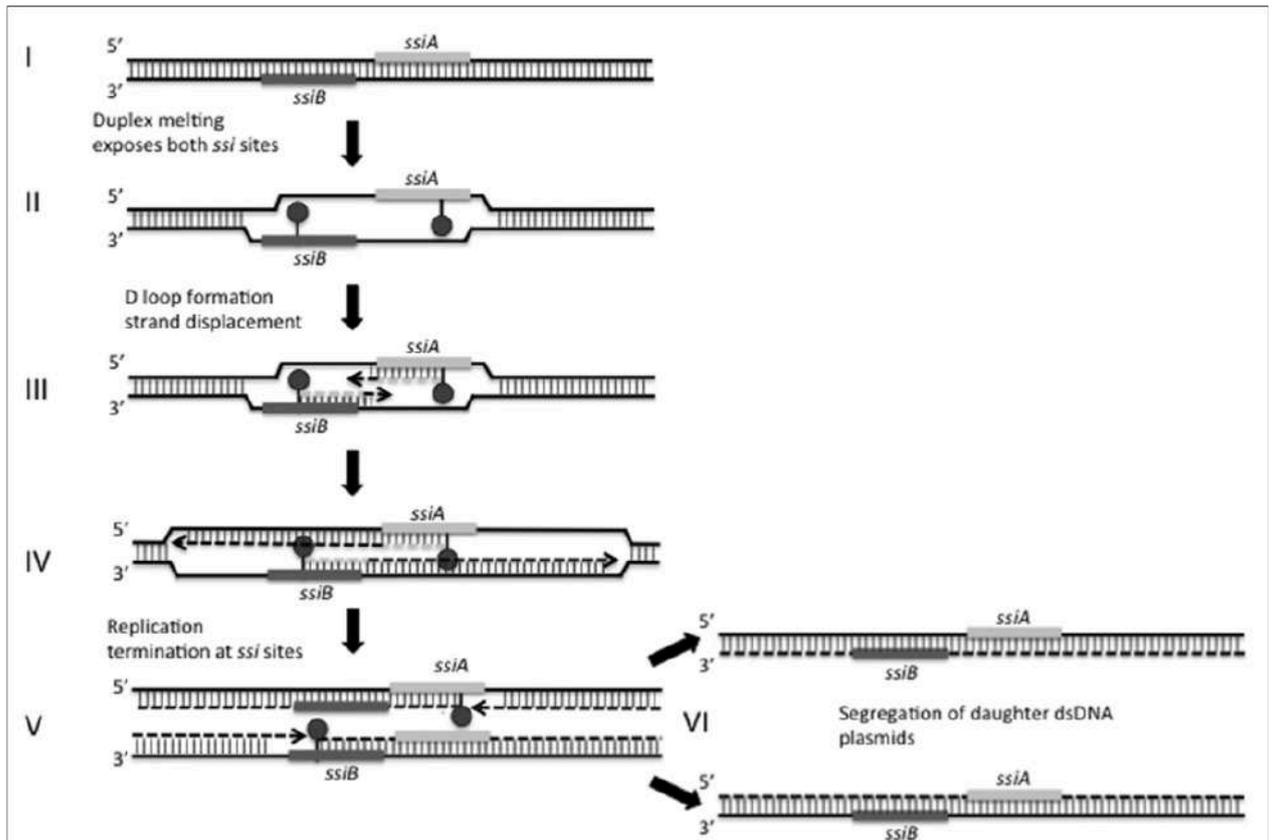


Figure I12. Modèle de la réplication Strand-Displacement chez RSF1010. (Lilly et Camps 2015). Les sites d'initiation (*ssiA* et *ssiB*) sont présentés sur le duplex d'ADN parental (I). Après ouverture de l'origine par RepC, les sites d'initiation simples brins se replient en épingle à cheveux (II) et sont reconnues par la primase RepB (III). L'élongation des brins complémentaires assistée par l'hélicase RepA (IV et V) conduit à la formation de deux molécules filles duplex (VI).

- Le phage λ

Le phage λ code seulement deux protéines, λO et λP impliquées dans le recrutement et la charge de l'hélicase DnaB à l'origine de réplication du phage λ ; ce cas représente un exemple de diversion de l'hélicase de l'hôte bactérien à des fins de réplication du génome phagique.

L'origine de réplication du phage λ (*ori* λ) contient une répétition de quatre séquences palindromiques presque identiques d'environ 19 paires de bases (bp) chacune, une région riche en nucléotides AT d'environ 40bp juste à droite et deux répétitions inversées plus à droite. La protéine λO se lie aux quatre séquences palindromiques de *ori* λ ; cette liaison conduit à une courbure de l'ADN et comme dans la formation du complexe couvert d'*Escherichia coli*, à la séparation locale des brins de la région riche en AT (Fig). La protéine λP se substitue à DnaC et se lie à l'hélicase DnaB puis le complexe λP :DnaB ainsi formé est recruté à *ori* λ via l'interaction entre le domaine N-terminal de λO et le domaine C-terminal de λP . Ce recrutement permet ensuite la charge localisée de DnaB. DnaB est inactif dans le complexe λP :DnaB ; ultérieurement, sous l'action des protéines de choc thermique (DnaK, DnaJ et GrpE), le complexe se dissocie et l'hélicase DnaB est activée. Le déroulement des brins de la molécule d'ADN est initié et les actions de la primase, de l'holoenzyme suivent (Kornberg A et Baker T 1992).

- Les hélicases répliquatives de type-MCM

Chez les eucaryotes, la gestion de l'hélicase répliquative (Mcm2-7) se déroule en deux étapes distinctes : (1) la charge de l'hélicase répliquative sous la forme d'un double hexamère, qui s'opère dans les phases tardives M et G1 du cycle cellulaire avec l'aide du complexe de reconnaissance de l'origine de réplication (ORC) et des cofacteurs protéiques cdc6 et cdt1 ; (2) l'activation des hélicases chargées en phase S du cycle cellulaire de manière dépendante des kinases DDK et CDK respectivement Kinase Dépendante de Dbf4 et Kinase Dépendante de Cycline (Bleichert 2019).

Le complexe ORC est l'initiateur de la réplication chez les eucaryotes et se compose de six sous-unités notées Orc1 à Orc 6 ; une fois recruté à l'origine de réplication et en association avec le cofacteur cdc6, l'ensemble constitué (ORC-cdc6) représente l'architecture compétente pour la charge de l'hélicase répliquative. L'hélicase répliquative eucaryote est un hétéro-hexamère dont les sous-unités Mcm2 à Mcm7 s'assemblent en hélice gauche laissant apparaître une discontinuité de contact entre les sous-unités Mcm2 et Mcm5. Cette conformation en hélice est stabilisée par le cofacteur cdt1 qui permet le maintien de l'ouverture générée par la discontinuité de contact entre Mcm2 et Mcm5 ; ce qui participe de même à la charge de l'hélicase. Une des premières interactions qui conduit à la charge ciblée de l'hélicase répliquative à l'origine de réplication, s'établit entre la sous-unité Mcm3 et le cofacteur cdc6 intégré dans l'architecture moléculaire ORC-cdc6 ; Mcm2-7 est ainsi recruté à l'origine de réplication. (Yuan *et al.* 2017). La liaison de cdt1, stabilisatrice de l'ouverture entre les sous-unités Mcm2 et Mcm5 est ensuite déterminante pour l'accès de la double hélice d'ADN dans la cavité de l'hélicase répliquative. Le cofacteur cdt1 semble jouer le rôle de chargeur.

Comme souligné ci-dessus, deux hexamères d'hélicase sont chargés à l'origine de réplication. Des expériences sur molécules uniques suggèrent que ces hexamères sont chargés de manière séquentielle. La charge de la deuxième hélicase implique cependant toujours ORC, cdc6 et cdt1 (Ticau *et al.* 2015, Ticau *et al.* 2017).

Les hélicases non répliquatives UvrD et Rep d'*Escherichia coli*

- L'hélicase UvrD

L'hélicase UvrD est essentiellement connue pour ses rôles dans la réparation par excision de nucléotides (NER: Nucleotide Excision Repair) et la réparation des mésappariements dirigée par la méthylation (MMR: Methyl-directed Mismatch Repair). Elle participe ainsi au maintien de l'intégrité de l'information génétique (Matson et Robertson 2006). Elle présente une fonction moins connue qui est de permettre le processus de réversion des fourches de réplication après dislocation du réplisome lors de la réplication. Dans les mutants thermosensibles *dnaEts* et *dnaNts* d'*Escherichia coli*, l'inactivation des sous-unités DnaE et DnaN du réplisome conduit à un arrêt puis une dislocation synchrone des fourches de réplication. En absence d'UvrD, les mutants *dnaEts* et *dnaNts* sont non viables. La double mutation Δ uvrD Δ recA rétablit la viabilité de ces souches. De même les doubles mutants concernant le gène *uvrD* d'une part et les protéines *recF*, *recO*, *recR* d'autre part, sont aussi viables en contexte *dnaEts* et *dnaNts*. Il apparaît qu'UvrD va à l'encontre de la recombinaison homologue dépendante de la voie alternative RecFOR (Flores et al. 2005). Il apparaît également que la fonction hélicase d'UvrD ne soit indispensable que pour le redémarrage des fourches avortées dans le mutant *dnaNts* (Lestini et Michel 2007 ; Lestini et Michel 2008).

- L'hélicase Rep

L'ensemble des études menées sur l'hélicase Rep l'implique dans un rôle d'hélicase facilitatrice de l'avancée du réplisome. Chez *E. coli*, les cellules dépourvues du gène *rep* sont viables mais montrent une réduction de moitié de la vitesse du réplisome (Lane et Denhart 1975 ; Colasanti et Denhart 1987). Deux pistes d'actions de Rep peuvent expliquer son rôle dans l'avancée du réplisome. La première concerne son action dans l'élimination des obstacles à l'avancée du réplisome. *In vitro*, il est montré que l'hélicase

Rep est capable d'éliminer des protéines fixées à l'ADN et permettre la réplication d'un substrat ADN par le réplisome (Guy *et al.* 2009).

Un double mutant des gènes *rep* et *uvrD* chez *E. coli* est non viable et n'est complémenté que par un allèle *rep* surnuméraire (McGlynn 2011). Cependant, des suppresseurs de cette létalité pour ce qui ont été identifié pour l'heure apparaissent dans le gène *rpoB* codant la sous-unité β de l'ARN polymérase ; un second type de suppresseur mis en évidence dans le gène *spoT1* conduit à l'accroissement de ppGpp dans les cellules, qui déstabilise à fortiori l'ARN polymérase (Guy *et al.* 2009). Ces résultats et le fait qu'il a été aussi montré que la protéine Rep interagit physiquement avec l'hélicase répllicative DnaB conduisent les auteurs à suggérer que l'hélicase Rep élimine les ARN polymérases qui bloquent l'avancée du réplisome (Guy *et al.* 2009).

La seconde piste d'action de Rep, provient de son implication dans le redémarrage des fourches de réplication dépendante de la protéine PriC (Sandler 2000). Au contraire de la protéine PriA, PriC ne possède pas d'activité hélicase ; Il est suggéré que l'hélicase Rep puisse dérouler le brin ADN retardée présent à la fourche de réplication pour permettre la charge de PriC et *in fine* la reformation de réplisome actif (Heller et Marians 2005).

Problématique, présentation de *Vibrio cholerae* et principaux résultats

La charge des hélicases répliquatives est une étape essentielle lors de l'initiation de la réplication. Les études qui ont portées sur DnaC et DnaI (DnaC/I) ont précédemment fait admettre que les chargeurs d'hélicases sont des facteurs nécessaires à la charge des hélicases répliquatives bactériennes. Les exemples d'hélicases répliquatives des organismes *H. Pylori*, *P. aeruginosa* et *P. putida* données plus haut remettent en cause cette acception.

Brézellec *et al.* (Brézellec *et al.* 2016) ont montré que les stratégies spécifiées par DnaC/I pour charger les hélicases répliquatives ne pouvaient plus être considérés comme représentatives du domaine bactérien; en effet sur les 26 phyla représentatifs actuellement du domaine bactérien, seuls 5 phyla possèdent des homologues de DnaC/I (Figure I13). Brézellec *et al.* (Brézellec *et al.* 2016) montrent également que les chargeurs d'hélicases DnaC/I ont été domestiqués au moins 7 fois dans l'évolution chez les bactéries au dépend d'une seule protéine nommée DciA (DnaC/I Antécédent) qui à l'inverse de DnaC/I se trouve largement répartie dans le domaine bactérien (Figure I13). De leur début de caractérisation de DciA chez l'organisme *Pseudomonas aeruginosa*, dépourvu des chargeurs DnaC/I, ils ont aussi montré, que le gène *dciA* est essentiel, et que la protéine (DciA) interagit avec l'hélicase répliquative DnaB. Par ailleurs, leurs résultats suggèrent que DciA interviendrait dans l'initiation de la réplication et plus précisément après la formation du complexe ouvert, étape précédant la charge de l'hélicase répliquative sur les simples brins de la molécule d'ADN (Brézellec *et al.* 2016).

Etant donné que les chargeurs DnaC/I et la protéine DciA sont mutuellement exclusifs, c.-à-d. que les organismes possédant les chargeurs DnaC/I ne possèdent pas la protéine DciA et inversement, nous pouvons nous poser deux questions : *Primo*, DciA est-il un chargeur d'hélicase comme DnaC/I ? *Secundo*, étant donné que nous avons montré dans notre introduction (chapitre 2) que des hélicases d'organismes dépourvus de

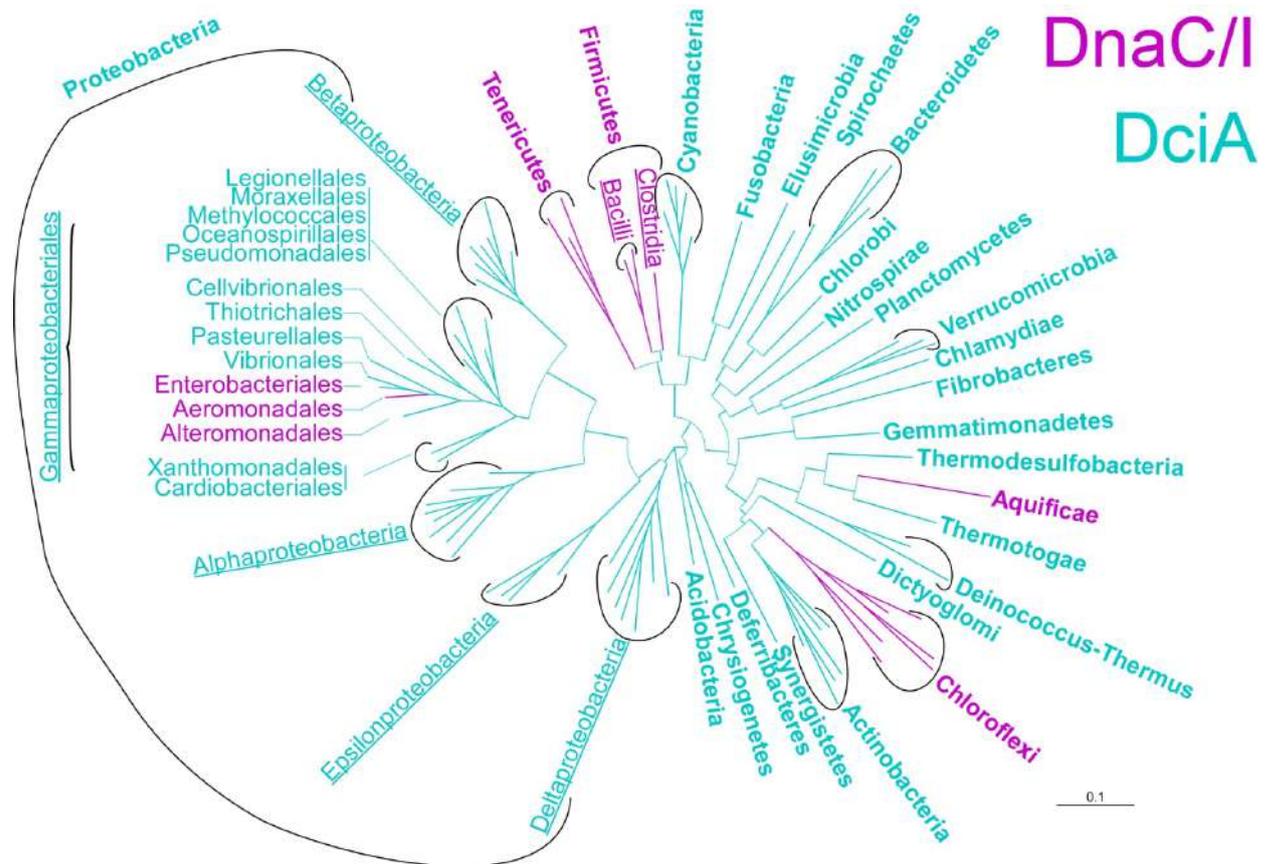


Figure I13. Distribution de DnaC/I et DciA dans le domaine bactérien. (Brézellec et al. 2016). Les 26 phyla actuellement connu du domaine bactérien sont représentés. Le phylum des protéobactéries est subdivisé en classes, dont l'une, celle des gamaprotéobactéries, elle même subdivisée en familles.

DnaC/I mais pourvus de DciA, à l'image de celle de l'organisme *H. pylori*, peuvent se charger d'elles-même sur l'ADN et aller jusqu'à compléter fonctionnellement chez *E. coli*, à elle seule, l'inactivation simultanée du chargeur d'hélicase et de l'hélicase réplivative d'*E. coli* (double mutant thermosensible *dnaB252 dnaC^{ts}*), nous nous sommes demandés, si DciA, chargeur ou pas chargeur d'hélicase, est essentiel à la charge des hélicases réplivatives au même titre que les chargeurs DnaC/I ?

Nous abordons ces deux questions par deux approches : en étudiant d'une part *in vitro* le rôle de DciA sur la charge de l'hélicase réplivative de *V. cholerae* (partie I de ma section RESULTATS) et d'autre part en caractérisant *in vivo* le phénotype de la réplivation résultant de la déplétion de la protéine DciA chez *V. cholerae*, par cytométrie, immunoprécipitation de chromatine (ChIP) et analyse de la fréquence des marqueurs (MFA) du génome lors de la réplivation (partie II de ma section RESULTATS). La partie III de ma section RESULTATS concerne une expérience à réaliser dont le but sera de reproduire la domestication du chargeur DnaC dans notre organisme modèle d'étude *Vibrio cholerae*.

Vibrio cholerae

V. cholerae est le pathogène responsable du choléra. Cette bactérie appartient à la famille des Vibrionaceae incluant huit genres bien définis : *Allivibrio*, *Catenococcus*, *Enterovibrio*, *Grimontia*, *Listonella*, *Photobacterium*, *Salinivibrio*, et *Vibrio* (Urbanczyk et al. 2007). Le génome de *V. cholerae* à l'instar des autres genres des Vibrionaceae, est réparti sur deux chromosomes (Heidelberg *et al.* 2000) ; le chromosome I (ChI), large de 3 Mbp, arbore la majorité des gènes de ménages et sa réplivation est initiée à *oriC1* par la protéine DnaA, l'initiateur canonique de la réplivation dans la plupart des bactéries ; le chromosome II (ChII), plus petit (1Mbp), contient peu de gènes essentiels et sa réplivation est initiée à *oriC2* par la protéine RctB, son initiateur spécifique.

oriC1 est similaire à *oriC*, l'origine de réplication du chromosome d'*Escherichia coli*, et il est suggéré que l'initiation de la réplication du chromosome I se déroule selon les mêmes modalités que celle du chromosome d'*E. coli* tant au niveau de la formation du complexe ouvert qu'au niveau de la régulation, à travers les mécanismes de séquestration de l'origine, de titration de la forme active de la protéine DnaA et de régulation du pool actif de DnaA via le mécanisme RIDA. En accord avec cette suggestion, il a été montré que *oriC1* peut fonctionnellement remplacer *oriC* chez *E. coli* (Demarre *et al.* 2010).

oriC2 présente quatre caractéristiques similaires à celles retrouvées dans la réplication de certains plasmides: l'impératif de la présence d'itérons (courtes séquences répétées d'ADN) pour l'initiation de sa réplication, la dépendance à un initiateur spécifique (*RctB*) autre que DnaA à l'image des initiateurs plasmidiques de nom générique Rep, un mécanisme de régulation de l'initiation impliquant une molécule ARN et la présence d'une région d'incompatibilité (Egan et Waldor 2003). L'origine du chromosome II, *oriC2*, est divisée en trois unités fonctionnelles (la région d'incompatibilité *InclI*, la région minimale de réplication *ori2*, et le gène *rctB*) qui regroupent l'ensemble des caractéristiques ci-dessus citées (Figure I14). Du fait de la présence d'un second chromosome chez l'ensemble des Vibrionaceae présentant tous, les mêmes caractéristiques ayant trait à sa réplication, il a été suggéré que ce chromosome est un plasmide acquis par un ancêtre de cette famille (Heidelberg *et al.* 2000; Egan et Waldor 2003).

L'initiation de la réplication des chromosomes I et II est asynchrone. Le chromosome II initie sa réplication lorsque 2/3 du chromosome I est répliqué; il en résulte que la terminaison de la réplication des deux chromosomes est pour sa part synchrone, du fait que le chromosome II mesure approximativement 1/3 de la taille chromosome I. En accord avec cette synchronie de la terminaison, lorsqu'on effectue une analyse de la fréquence des marqueurs du génome (MFA), les nombres de sites de la

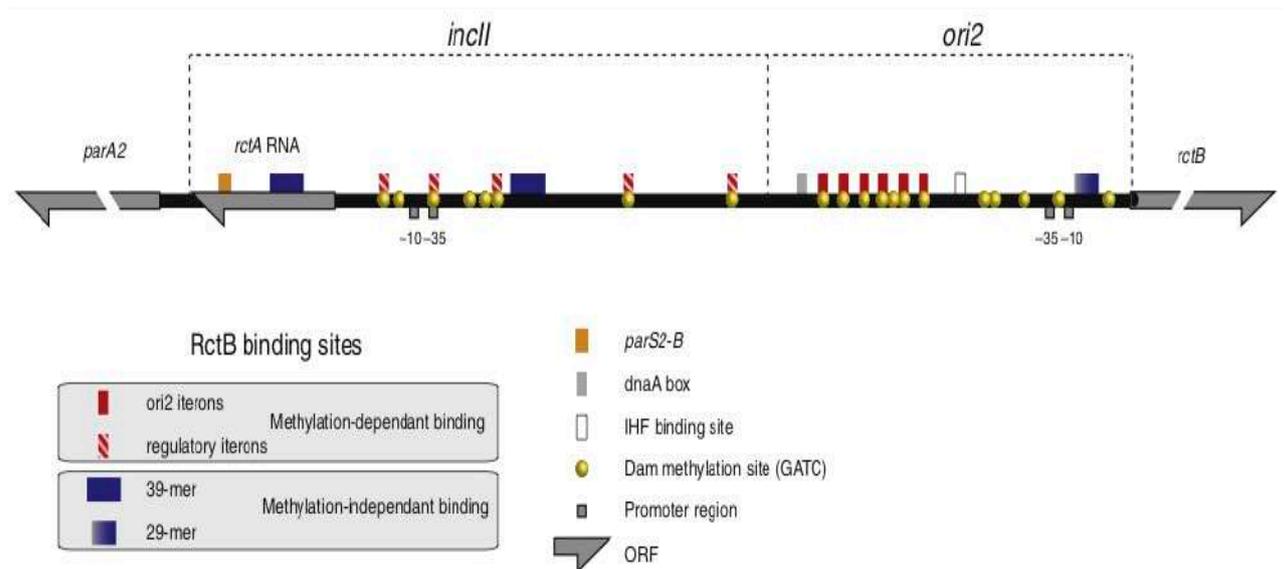


Figure I14. Organisation d'*oriC2* et régulation de l'initiation de la réplication. (Val et al. 2014). La région minimale *ori2* comporte 6 itérons où se lie la protéine RctB, ce qui génère probablement l'équivalent d'un complexe ouvert. Nous avons également présence d'une boîte DnaA et d'un site de liaison de la protéine IHF proposés comme intervenant dans l'initiation de la réplication comme à *oriC* chez *E. coli*. Dans cette même région, se situe une séquence nommée 29-mer qui assure le rôle d'opérateur transcriptionnel du gène *rctB*, jouant ainsi dans la régulation de l'initiation de la réplication. La région *IncII* contient, des itérons dits régulateurs et des séquences nommées 39-mer, qui servent à titrer la protéine RctB, régulant ainsi le pool de RctB nécessaire à l'initiation de la réplication. La force de liaison de RctB, à la séquence 39-mer à cheval sur le gène *rctA* est modulée via la transcription de ce même gène; l'ARN *rctA* participe donc de même au contrôle de l'initiation de la réplication. Il est à noter que la fixation de RctB sur les séquences itérons régulateurs ou non et les séquences 39-mer et 29-mer est dépendante de leur état de méthylation; RctB se lie aux itérons uniquement lorsqu'ils sont méthylés. Cette dépendance à l'état de méthylation entre en accord avec les nombreux sites GATC (boule jaunes) qui se retrouve dans ces séquences itérons.

terminaison, *ter1* et *ter2* (régions qui représentent respectivement les localisations de la fin de la réplication des chromosomes I et II) sont identiques; ce qui conduit à un rapport *ter1/ter2* égale à 1. Par contre, le rapport *oriC1/oriC2* est supérieur à 1; environ voisin de 2 (Rasmussen et al. 2007).

Les modalités qui conduisent à la formation du complexe ouvert chez le chromosome I de *V. cholerae* et *in fine* à la charge localisée de l'hélicase répliquative à l'origine de réplication sont somme toute, similaires à celles retrouvées chez *E. coli* pour l'initiation de la réplication de son unique chromosome (Egan et Waldor 2003). Celles qui conduisent à la charge localisée de DnaB à l'origine du chromosome II sont quant à elles, inconnues. De nos connaissances sur l'initiation de la réplication chez *E. coli*, nous savons que des monomères de DnaA s'aggrègent de manière ordonnée au niveau de *oriC* pour former le complexe ouvert (Chovadarapu et Kaguni 2016); ceux-ci sont également impliqués dans le recrutement de DnaB à l'origine de réplication, ce qui favorise la charge localisée de l'hélicase DnaB à *oriC* (Chovadarapu et Kaguni 2016). L'identité des monomères qui conduisent cependant au recrutement de DnaB est difficilement accessible du fait des nombreuses boîtes DnaA qui sont présentes à l'origine, *oriC*, de réplication du chromosome d'*E. coli*. Nous savons que le processus d'initiation de la réplication du chromosome II dans sa globalité est dépendant de DnaA mais que la formation du complexe ouvert à *oriC2* n'en est pas tributaire (Egan et Waldor 2003). Nous savons de plus, qu'il existe une seule et unique boîte DnaA à *oriC2* (Egan et Waldor 2003); nous comptons tirer parti de cette caractéristique présente chez *V. cholerae* et en general chez les Vibrionaceae, afin d'approcher l'identité du ou des monomères de DnaA qui contribueraient de manière similaire chez *E. coli* au recrutement puis à la charge localisée de DnaB aux origines de réplication.

Principaux résultats

Nous montrons *in vitro* que l'hélicase répliquative de *V. cholerae* au contraire de celle du modèle *E. coli* est active et capable de se charger seule sur l'ADN indépendamment de tout facteur. Nous mettons en évidence dans l'article joint à cette thèse (Marsin *et al.*) que VcDnaB est dynamique en solution au contraire de l'hélicase d'*E. coli* qui reste figé dans une seule conformation en solution; ayant obtenu la structure cristalline du complexe formé entre l'hélicase répliquative de *V. cholerae* et sa protéine DciA (VcDnaB:VcDciA), nous confirmons l'interaction entre DnaB et DciA précédemment mise en évidence par double hybride avec les homologues de ces deux protéines chez *P. aeruginosa* (Brézellec *et al.* 2016). Par diffusion de rayons X aux petits angles (SAXS: Small Angle X-rays Scattering) et cristallographie, Marsin *et al.* (article joint) montrent que DciA stabilise l'hélicase répliquative de *V. cholerae* sous sa forme fermée; résultat incompatible avec le fait de considérer DciA comme étant un chargeur d'hélicase à l'image de DnaC/I. Cependant, nous montrons que la charge de l'hélicase est stimulée *in vitro* en présence de DciA. Afin de réconcilier ces deux résultats *a priori* non concordants, nous proposons que la forme fermée de l'hélicase répliquative DnaB, induite par DciA, présente une forte affinité à l'ADN, supérieure à celle de l'hélicase seule, ce qui *a posteriori* accroît la quantité d'hélicase chargée sur l'ADN observée *in vitro*. Cette hypothèse suggère donc que c'est la liaison de l'hélicase à l'ADN qui déclenche sa charge; le parallèle avec la charge du facteur de terminaison de la transcription bactérien Rho qui est également une hélicase mais non répliquative, est donné comme exemple de mécanisme similaire.

Dans un second temps, nous montrons, *in vivo*, l'essentialité du gène *dciA* chez *V. cholerae*, auparavant montrée chez *P. aeruginosa* (Brézellec *et al.* 2016), *Mycobacterium tuberculosis* et *Mycobacterium smegmatis* (Mann *et al.* 2017). Nous montrons également, *in vivo*, par cytométrie de flux et immunoprécipitation de chromatine (ChIP) que VcDnaB se charge et est active sur l'ADN en absence de VcDciA; ce qui, de concert avec nos résultats

in vitro nous poussent à dire que DciA ne peut pas être considéré comme un chargeur d'hélicase comme DnaC/I. Cependant la perte de la synchronie de l'initiation de la réplication et du rythme auquel l'initiation de la réplication sont déclenchés dans les cellules dépourvues de DciA, nous conduisent comme Brézellec *et al.* à confirmer l'implication de DciA dans l'initiation de la réplication. L'analyse de la fréquence des marqueurs du génome de *V. cholerae* suggère un rôle de DciA dans la coordination des deux machineries de réplication permettant une réplication simultanée des réplichores droit et gauche du chromosome I de *V. cholerae*. Le chromosome II, selon nos résultats, semble ne pas être affecté lors de sa réplication par l'absence de DciA; des investigations supplémentaires demeurent nécessaires pour l'affirmer.

RESULTATS

Partie I. Les hélicases des organismes à DciA se chargent seules *in vitro*

Replicative helicases of *dciA*-species are DNA self-loading enzymes

Stéphanie Marsin^{1#}, Yazid Adam^{1#}, Jessica Andreani¹, Sonia Baconnais³, Pierre Legrand⁴, Ines Gallay-Li de la Sierra¹, Claire Cargemel¹, Hélène Walbott¹, Adeline Humbert¹, Magali Aumont-Nicaise¹, Christophe Velours¹, Françoise Ochsenbein¹, Dominique Durand¹, Eric Le Cam³, Christophe Possoz¹, Sophie Quevillon-Cheruel^{1¶}, Jean-Luc Ferat^{1,2¶}

¹ Institute for Integrative Biology of the Cell (I2BC), CEA, CNRS, Univ. Paris-Sud, Université Paris-Saclay, 91198, Gif-sur-Yvette cedex, France.

² Université de Versailles Saint Quentin, 45 avenue des Etats Unis, 78000 Versailles.

³ Signalisations, Noyaux et Innovations en Cancérologie, UMR 8126, CNRS, Université Paris-Sud, Gustave Roussy, Université Paris-Saclay, 94805 Villejuif, France.

⁴ Synchrotron SOLEIL, L'Orme des Merisiers, 91192 Gif-sur-Yvette, France

These authors contributed equally to this work

¶ Correspondence: sophie.quevillon-cheruel@i2bc.paris-saclay.fr, Jean-Luc.FERAT@i2bc.paris-saclay.fr

Abstract

Replicative helicases are universal and essential proteins that unwind double stranded DNA in front of replication forks. The loading of these enzymes on DNA at the onset of replication is proposed to be dependent on accessory proteins in the three domains of life. We show, however, that in *dciA*-bacterial species (contrary to those that possess *dnaC/l*), DnaB replicative helicases specify DNA self-loading activity. The structure of the helicase presented here, free or complexed with DciA, support this conclusion and further imply that DciA is not a helicase loader but rather a replicative helicase chaperone that enhances the helicase self-loading activity. Finally, we present *in vivo* and *in vitro* DnaB mutant analyses, supported by structural homology between DciA and two other replicative helicase binding proteins involved during replication initiation [the replication initiator (DnaA) and the β -clamp loader (DnaX)], suggesting a broader implication of DciA in replication initiation licensing.

Introduction

Replicative helicases unwind double stranded DNA in front of the replication fork in the three domains of life. These essential enzymes split into two distinct branches of unrelated origin. Bacterial replicative helicases (DnaB) belong to the superfamily 4 (SF4) and translocate on the lagging strand in the 5'→3' direction, whereas the MCM (Mini Chromosome Maintenance) helicases of Archaea and Eukaryotes belong to the superfamily 6 (SF6) and translocate in the 3'→5' direction on the leading strand¹. Bacterial replicative helicases are toroid homo-hexamers²⁻⁴. Each DnaB subunit consists of two structural domains, a N-terminal domain (NTD) and a C-terminal domain (CTD) that harbors a RecA-like fold³, connected to each other through an α -helix linker (LH). Within helicase hexamers, adjacent NTD moieties interact two by two through coiled coil contacts to form homodimers that associate with each other into a trimer of dimers, whereas CTDs interact with each other according to a hexameric symmetry⁴⁻⁶.

The loading and the activation of replicative helicases onto DNA are critical steps of replication that are strictly regulated to prevent the initiation of unforeseen replications. In Eukaryotes, loading and activation of MCM₂₋₇ are uncoupled and strictly insulated in G1 and S phase, respectively⁷. The delivery of replicative helicase at *oriC* during replication initiation was studied in model organisms from the standpoint of the two domesticated phage helicase loaders : DnaC and DnaI. This led to the characterization of two loading strategies. In organisms such as *E. coli*, the helicase is cracked open by DnaC in a “ring-breaker” strategy. In others, like *B. subtilis*, DnaI assists the assembly of the helicase around DNA according to a “ring maker” scenario⁸⁻¹⁰. In these bacterial systems, loading and activation of replicative helicases are believed to be coupled, merely resulting from consecutive structural reorganization of the helicase following its binding on ssDNA; the control of replication initiation in bacteria is proposed to be implemented at an earlier stage, when the initiator protein DnaA aggregates orderly at the unique origin of replication of the chromosome, *oriC*, to form the open complex¹¹.

Yet, most bacteria lack *dnaC/I*. The vast majority possesses instead *dciA*, a gene of ancestral and bacterial origin that encodes a factor shown to interact with the replicative helicase and to be essential in the early steps of replication initiation^{12,13}. Phylogenetic analyses showed that the emergence of the *dnaC/I* gene in the bacterial domain occurred by waves of domestication of phage helicase loader and systematically at the expense of *dciA*¹². The fast elimination of *dciA* upon domestication of *dnaC*, suggesting incompatibility between the two proteins,

remains elusive. Yet, the frequent replacement of *dciA* by a phage-related gene through evolution suggests that the activities specified by these different factors can fulfill eventually the same function.

Here, we investigated the ancestral and bacterial replicative helicase loading system. We studied through surface plasmon resonance (SPR), helicase assays and structural analyses, the replicative helicase of *Vibrio cholerae* and the implication of DciA in its loading on DNA and its activation. We show that the helicase of *V. cholerae* possesses unexpected properties that distinguish it markedly from those depending on DnaC/I. In solution, the helicase of *V. cholerae* is not locked into a ring-like structure, but opened, dynamic and proficient for its own loading on DNA. We show that DciA improves the efficiency of loading of the replicative helicase while inducing the formation of a closed planar structure, indicating that DciA is not a helicase loader but rather protein that specify a helicase chaperone activity. We show that VcDciA stabilizes a DNA-free ring-like structure by interacting at the periphery of the CTD of the helicase with a protein motif composed of two α helices located at the junction between two VcDnaB subunits. This motif encompasses the linker helix (LH) that connects the NTD and the CTD of the helicase and another anti-parallel α -helix (hereafter referred to as CH) containing a co-occurrence and critical residue that strictly differentiates helicases from *dciA*- and *dnaC*-species. Finally, we obtained nuclear magnetic resonance (NMR) and X-ray data showing that the core domain of DciA is related to a fold found in other DnaB-binding proteins involved at different steps during replication initiation (the initiator protein DnaA and the clamp loader DnaX), advocating for an implication of DciA also in the sequence of events ranging from the formation of the replication initiation complex to that of an activated replisome.

Results

VcDnaB loads and activates itself on DNA. The identification of *dcfA* in *dnaC*-lacking bacteria and the implication of DcfA and DnaC at an early step of replication initiation led to the hypothesis that DcfA and DnaC specify the same function¹². Granted that the loading of *EcDnaB* is dependent on *EcDnaC*, we designed biochemical assays to assess the requirement for DcfA during the loading and the activation of the replicative helicase of *Vibrio cholerae*, *VcDnaB*.

First, we performed a surface plasmon resonance (SPR) analysis to assess the ability of *VcDnaB* to load itself on DNA. We designed a 5' protruding end DNA substrate to record both loading and threading of the helicase on DNA (Material and Methods). When loaded on DNA, the 5' → 3' translocation of the replicative helicase on DNA results in its trapping at the interface between the ssDNA and the matrix on which is anchored the DNA substrate (Fig. 1a). The amount of *VcDnaB* trapped on DNA increases as a function of the quantity of helicase injected (Fig. 1b). We demonstrated that this trapping corresponds to an actual loading and not a random binding of the helicase on DNA, using a 3' protruding end DNA substrate (Supplementary Fig. 1a). We performed the same experiment with the replicative helicase of *E. coli* and showed that in contrast with *VcDnaB*, free *EcDnaB* is not able to load itself on DNA, as previously described (Fig. 1b)¹⁰.

We then followed the unwinding of the Cy5-labelled moiety of a branched DNA substrate whose 5' end is accessible for the helicase either for loading or threading (Fig. 1c, Material and Methods). When *VcDnaB* was added to the reaction mixture, a faster migrating product corresponding to the Cy5-labelled oligonucleotide appeared at the bottom of the gel (Fig. 1d top, 1e). Unwinding activity was not detected when the same experiment was performed without *VcDnaB* (Fig. 1e). When the access to the 5'-protruding end was forbidden by addition of Streptavidin during the assembly of the branched DNA substrate (Material and Methods), thereby preventing threading, free Cy5-labelled oligonucleotide was still produced after addition of *VcDnaB* (Supplementary Fig. 1b), indicating that the helicase can load, activate itself upon loading and translocate on DNA. Consistent with our SPR results, we observed no unwinding when *EcDnaB* was analyzed under the same experimental conditions (Fig. 1d bottom, 1e).

Altogether, these results indicate that the replicative helicase of *V. cholerae* can load and activate itself on DNA without any assistance unlike that of *E. coli*, suggesting distinctive structural features between the two types of helicases.

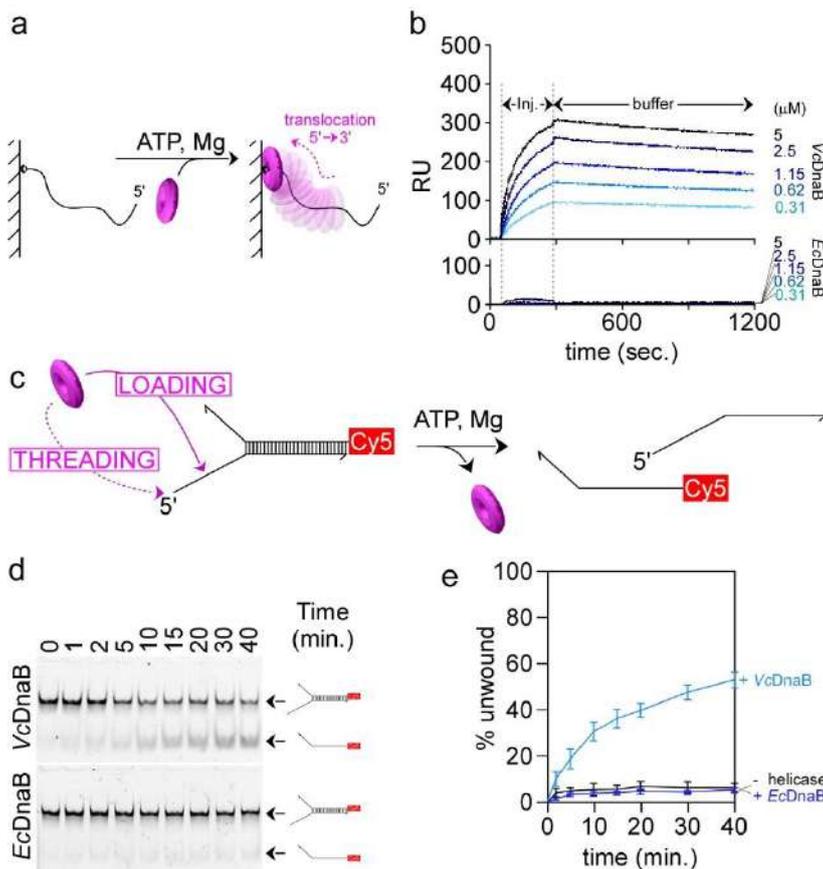


Fig. 1. VcDnaB self-loads on DNA. a, Experimental design. The single stranded substrate DNA molecules were bound to the SPR matrix through their 3' biotinylated extremity, leaving a 5' end accessible. After addition of the helicase to the reactive mixture, the loading of the helicase on DNA is expected to give rise to a translocation motion in the 5' → 3' direction, trapping the helicase at the interface between the matrix and the DNA substrate. **b,** SPR analysis of the loading of VcDnaB on DNA. VcDnaB (top) or EcDnaB (bottom) were injected for 240s (inj.) in a buffer solution containing ATP and MgCl₂ (Material and Methods). Dissociation was assessed in the same buffer (buffer). Various concentrations of helicase were assayed. The amount of DNA-bound helicase is proportional to the Response Units (RU on the ordinate axis). **c,** Experimental design of the helicase assay. The branched DNA substrate used in these series of experiments consisted

in a 25 bp-long double stranded DNA molecule prolonged by two non-complementary single stranded DNA (25 and 50 nucleotides long at 3' and 5' extremities, respectively). A Cy5 fluorophore was added at the 5' end of the 50 nucleotide long oligonucleotide (blunt end of the branched molecule) to enable the detection of DNA molecules and to assess DNA unwinding. In presence of ATP and Mg²⁺, the loading/threading of the helicase on this substrate and its translocation in the 5' → 3' direction leads to DNA unwinding. **d,** DNA unwinding kinetics. At regular time intervals, samples were taken from the reaction mixture, mixed with a STOP solution and run on a 8% acrylamide gel. The top panel was obtained with VcDnaB whereas that at the bottom was obtained with EcDnaB. A description of the migration products is given on the right. **e,** DNA unwinding quantification. Graphic representations of the accumulation of Cy5-unwound product over the time are presented for VcDnaB and EcDnaB (three independent experiments, mean +/- SEM).

Free VcDnaB is dynamic. We combined electron microscopy (EM), small angle X-ray scattering (SAXS) and X-ray crystallography to determine the characteristics of VcDnaB. SAXS analyses coupled with a Size Exclusion Chromatography of VcDnaB in solution and in absence of nucleotide (Material and Methods) showed that the average molar mass of the scattering object decreased continuously during the elution of the protein (red line in Fig. 2a top), reflecting the great polydispersity of the sample and the presence of oligomers of various sizes. EM analysis confirmed that VcDnaB incubated in a nucleotide-free buffer (Material and Methods) is arranged in a great diversity of oligomeric structures (Fig. 2a top).

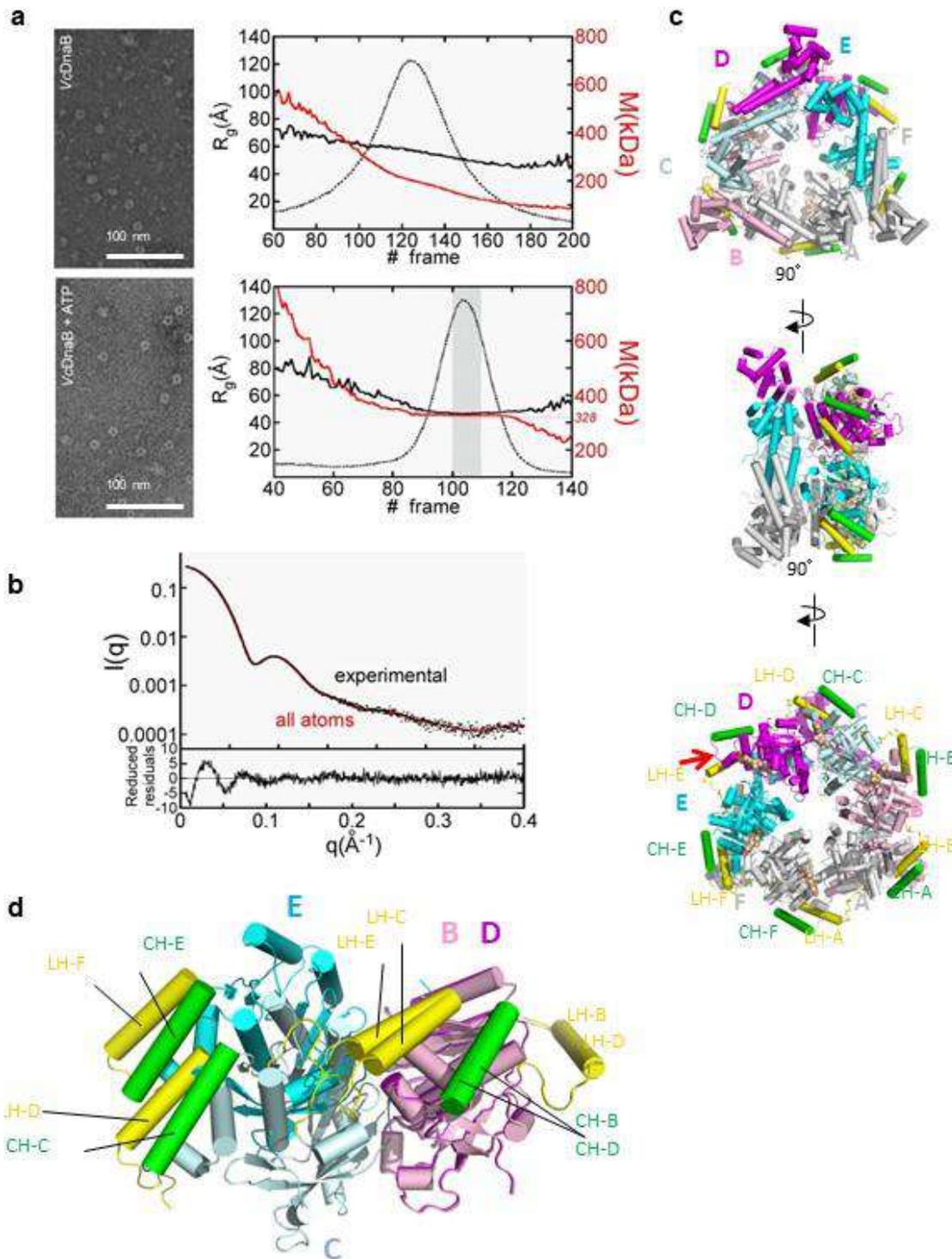


Fig. 2. Free VcDnaB is open and dynamic. **a**, Influence of ATP on the hexamerization of VcDnaB. Analysis of VcDnaB was carried out without ATP (top) or preincubated with ATP (bottom) by negative staining electron microscopy (left) and SAXS coupled with size exclusion chromatography (right). The amounts of particles per surface unit (su) are indicated. The white bar represents a distance of 100 nm. The evolution of the gyration radius R_g (thick black curves) is represented during the SEC-SAXS elution, together with the molar mass (red curves) and the forward scattered intensity $I(0)$ (thin dashed black curves). The dark grey rectangle (bottom right) corresponds to the zone of elution

where the successive SAXS curves are rigorously identical and their average was analyzed by SAXS. **b**, Superimposition of the curve calculated on the all-atoms model of VcDnaB•ATP (red curve, the missing fragments of our DnaB•GDP•AlF₄ crystal structure were added using the program DADIMODO^{14,15}) against experimental data (black dots). The corresponding distribution of reduced residuals, reflecting the variation between the two profiles, is presented at the bottom of the panel figure. **c**, Crystal structure of GDP•AlF₄-bound VcDnaB. Three angles of view of the model are represented, the NTD face (top), the side (middle) and the CTD face (bottom). The six VcDnaB subunits are represented in pink (B), light blue (C), magenta (D), cyan (E) or in grey (A, F). The LH and the CH are in yellow and green, respectively. The position of the six GDP (orange dots) in the crystal structure is indicated. The red arrow indicates the opened zone between the subunits D and E. **d**, Superimposition of the B+C and D+E homodimers of VcDnaB. B and D monomers (pink and magenta) were aligned to highlight the shift between the two C and E monomers (light blue and cyan), in response to the opening of the hexamer ring between the D and the E subunits (indicated by a red arrow in (c)).

In contrast, in the presence of ATP (and also AMP-PNP or ADP, [Supplementary Fig. 2](#)), the proportion of VcDnaB organized in ring-like structures increased significantly ($67 \pm 8/\text{su}$ with ATP vs. $34 \pm 8/\text{su}$ without ATP, [Fig. 2a bottom](#), [Material and Methods](#)). SAXS curve analysis of VcDnaB in the presence of ATP confirmed this observation. The molar mass and the radius of gyration of the protein are constant near the elution peak maximum, reflecting the homogeneity of the hexamer (measured mass of 328 ± 20 kDa to be compared with the calculated mass of 317 kDa, [Fig. 2b](#), [Supplementary Table 3](#)). Hence, VcDnaB requires nucleotides to organize itself into a hexamer ring, which again contrasts with the replicative helicase of *E. coli* or *G. stearothermophilus* that hexamerizes in absence of nucleotide^{2,3}.

We obtained a crystal structure of the free helicase VcDnaB bound to GDP•AlF₄ by molecular replacement ([Material and Methods](#)) ([Fig. 2c](#)). Data were corrected for anisotropy using STARANISO (<http://staraniso.globalphasing.org>) and the structure was refined at 3.9 Å resolution ([Table S2](#)). Consistent with other bacterial replicative helicase ring-like structures, VcDnaB is organized in two layers, corresponding to the NTD and CTD domains of the protein, connected through the linker helix (LH, in yellow in [Fig. 2c, 2d](#)). The NTD ring is organized in a triangular configuration of three homodimers ([Fig. 2c top](#)), whereas the six RecA-fold CTD of the helicase are arranged according to a 6-fold symmetry ([Fig. 2c bottom](#)). In each DnaB subunit, the CTD is located 60° away from the NTD, placing the LH above the CTD of the next DnaB subunit ([Fig. 2c](#)). The hexamer contains six GDP•AlF₄ molecules and six Mg²⁺ ions within their catalytic sites located at the interface between two adjacent subunits of DnaB. We tested this crystal structure (all atoms) by comparing it with the SAXS experimental curve of VcDnaB in solution in presence of ATP ([Fig. 2b](#), [Material and Methods](#)). The fit to the experimental curve with our VcDnaB•GDP•AlF₄ crystal structure, completed with the missing fragments, (^{14,15}, [Supplementary Table 3](#)) is fairly good with $\chi^2 = 3.83$, indicating that the crystal structure of VcDnaB is representative of the structure of the helicase in solution ([Fig. 2b](#)).

The NTD ring of our VcDnaB•GDP•AlF₄ X-ray structure adopts a dilated conformation with a width of the internal chamber of 25 Å ([Fig. 2c](#)). The hexamer is slightly opened at the interface of the CTD domains between the D and E monomers (red arrow, [Fig. 2c bottom](#)). The superimposition of the B+C and the D+E dimers indicates that when B and D subunits are perfectly superposed, subunits C and E are not, as a consequence of the reorientation of entire linker domain, including the LH and the unstructured flexible region with respect to another helix of the adjacent DnaB subunit (represented in green and named CH for reason that will be explained below, [Fig. 2d](#)). In

complete support, in a small range at the beginning of the SEC-SAXS elution peak, the radius of gyration decreased slightly while the mass remained constant, suggesting that the hexamer ring oscillates around this slightly opened form in solution (Fig. 2a bottom). Such an oscillation could also be at the origin of the slight difference between SAXS calculated and experimental curves visible on Fig. 2b. This conformation differs from that of ADP-bound DnaB of *Aquifex aeolicus* complexed with ADP, which is constricted, closed and planar (PDB code 4NMN, internal chamber = 15 Å) and confirms that VcDnaB features are distinct from those of DnaC-helicases ².

VcDciA stimulates the loading of VcDnaB on DNA. The ability of VcDnaB to load and activate itself on DNA without any assistance raises the question of the function of DciA during replication initiation. We investigated the loading of VcDnaB on a free 5' end DNA substrate in presence of VcDciA by SPR. At a constant concentration of VcDnaB, the amount of DNA-bound helicase increases with the concentration of VcDciA to reach a maximum binding at VcDnaB/VcDciA ratios of 6/3 (Fig. 3a). Granted that the interaction of DciA on DNA is negligible (Supplementary Fig. 3a), we concluded that VcDciA stimulates the loading of the helicase on DNA by about 3 fold.

We analyzed also the implication of DciA through our helicase assay. Whether the 5'-end of the branched DNA substrate is accessible or not, the addition of DciA improved the production of free Cy5-labelled oligonucleotide (Fig. 3b,c and Supplementary Fig. 3b). Kinetics, performed with various VcDnaB/VcDciA ratios, showed that a significant effect was observed at a low 6/1 VcDnaB/VcDciA ratio. Consistent with our SPR results, a maximum unwinding yield was obtained for DnaB/DciA ratios of 6/3 or above (Fig. 3c).

The SPR profile obtained when DciA was added to the reaction mixture revealed a biphasic dissociation curve (Fig. 3a). An abrupt reduction of the amount of DNA-bound protein was observed immediately after injection, followed by a slight and continuous slope diagnostic of the slow dissociation of VcDnaB observed earlier (Fig. 1b). To determine which protein dissociated immediately after injection, we repeated the experiment in absence of Mg²⁺, the catalytic divalent cation of the helicase. Under such experimental conditions, the translocation of the helicase was prevented, leaving the enzyme immobile where it was loaded (Fig. 3d). The SPR profile obtained after the injection of VcDnaB+VcDciA in absence of Mg²⁺ (inj. 1) showed that protein mass was released immediately upon injection, as in the experiment performed in presence of Mg²⁺ (compare Fig. 3a and inj. 1 in Fig. 3e,f). Then, we performed a second injection of either VcDciA, VcDnaB or both proteins (inj. 2, Fig. 3e,f). The injection of VcDciA led to an evanescent rise of the binding response of an amplitude identical to that recorded during the first injection.

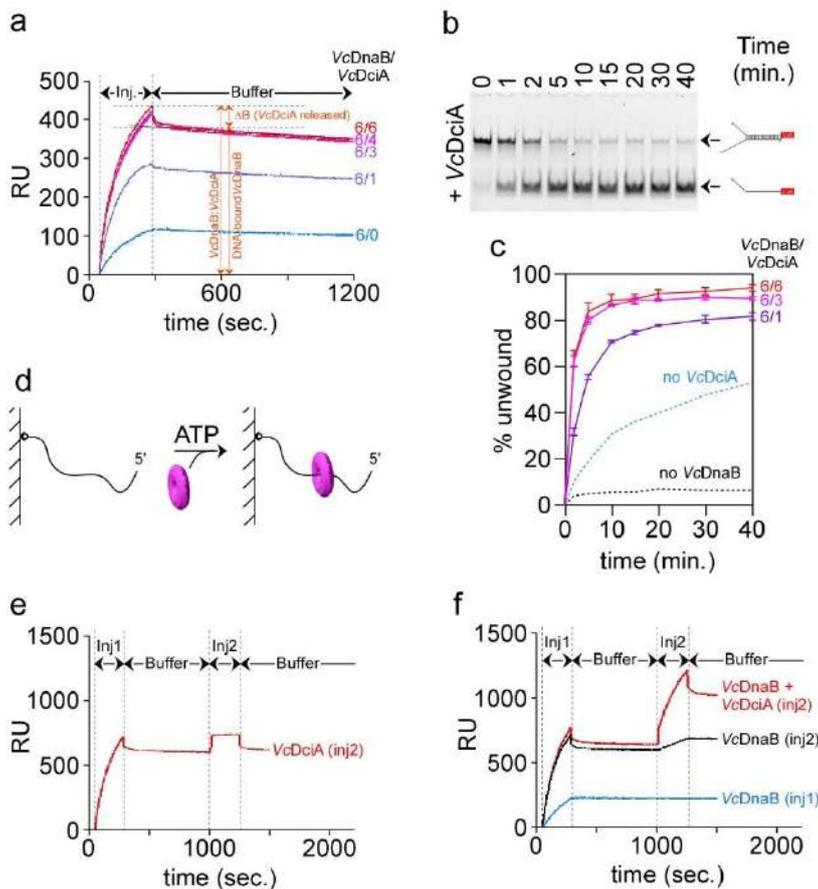


Fig. 3. VcDciA stimulates the loading of VcDnaB on DNA. **a**, SPR analysis of the loading of VcDnaB on DNA in presence of VcDciA. Experiments were conducted as described in Figure 1B in presence of VcDnaB at 625nM. Different VcDnaB/VcDciA ratios (from 6/0 to 6/6 in subunits) were analyzed. ΔB represents the mass of VcDciA proteins that dissociated immediately after the loading of the VcDciA•VcDnaB complex on DNA. **b**, DNA unwinding kinetics in presence of VcDciA. The experiments were carried out as described in Figure 1D, except that VcDciA (variable concentrations) was added to VcDnaB (625 nM). The types of migration products are indicated on the right. **c**, DNA unwinding quantification in presence of VcDciA. The procedure is the same as that described in Figure 1E. The error bars correspond to the mean \pm SEM of three independent experiments. **d**, Helicase loading in absence of Mg^{2+} . The experiment is carried out in absence

of Mg to prevent the activation of the helicase and its translocation on DNA in the 5' \rightarrow 3' direction until its release. ATP was added for it is required for the hexamerization of the helicase. **e**, After injection of VcDciA•VcDnaB (injection 1, 1.25 μ M in subunits) and a "dissociation" step performed with the protein-free buffer, a second injection of an equimolar amount of VcDciA was performed (inj. 2) giving rise to a transient binding of VcDciA on the VcDnaB•DNA complex. **f**, The experiment was performed in the conditions described in Figure 3E, except that the second injection contained either VcDnaB alone (equimolar amount, black) or the VcDciA•VcDnaB complex (equimolar amount, red). The blue curve corresponds to the profile of VcDnaB alone.

This increase last solely the time of injection 2, indicating that VcDciA could interact transiently with the DNA-protein complex (Fig. 3e). In contrast, when VcDnaB or VcDnaB+VcDciA were reinjected, we observed a binding profile identical to that obtained during the respective injection 1 of VcDnaB or VcDnaB+VcDciA (Fig. 3f). These results show unambiguously that VcDciA, and not VcDnaB, is released upon binding of the protein complex on DNA. It further suggests that the conformation of the helicase is modified upon binding of the helicase complex on DNA, causing the release of VcDciA. It is noteworthy that the release of VcDciA was observed whether Mg^{2+} was added or not to the reaction, indicating that the modulation of the conformation of the helicase upon binding on DNA and the ensuing release of VcDciA are independent of the hydrolysis of ATP. Assuming that the first dissociation reflects that of VcDciA, the variation of the binding response observed (ΔB) represents a fair indicator of the protein mass released and hence of the protein stoichiometry in the VcDnaB•VcDciA complex. Our assessment of ΔB (represented

graphically in Fig. 3a) is consistent with a VcDnaB/VcDciA stoichiometry of 6/3 (VcDnaB⁶ MW = 317 kDa, VcDciA³ MW = 52.2 kDa) (Fig. 3a).

VcDciA shares a domain with other replication initiation proteins. In eukaryotes, CDC6 and ORC1 are two AAA⁺ proteins related to each other and believed to derive from a common ancestor. A similar inference was drawn between DnaC/I and DnaA, due also to the relatedness between the AAA⁺ domains of the two types of proteins¹⁶. Strikingly, the HHPred-predicted structure of DciA does not contain a AAA⁺ domain^{17,18}, but instead a globular domain predicted to structurally resemble the NTD of DnaA (PDB 4TPS, 2E0G), the CTD of DnaX (τ5, PDB 2AYA) and the flagellar hook-length control protein FliK (PDB 2RR1) (Material and Methods).

To confirm this prediction, we collected nuclear magnetic resonance (NMR) chemical shift data for the backbone of the NTD domain of VcDciA encompassing residues M1 to A111, using the ¹³C-¹⁵N labelled and purified protein (Materials and Methods and Supplementary Fig. 4a). Using these data, we computed chemical shift indices to identify secondary structure elements in this domain (Supplementary Fig. 4b,c) and built 3D representations of VcDciA^[1-111] to generate a structural model of the NTD domain of VcDciA. This domain is characterized by a mostly globular fold containing a long NTD helix spanning residues L12 to I38, a three-strand β-sheet from residues V47 to A61 and S91 to V96, one α-helix from residues A64 to N84, kinked around positions 73-74, and another one between residues E99 to Y101 (Fig. 4a). Overlay of the NMR structure of DciA with the NTD of DnaA or with the CTD of DnaX show that the scaffolding shared by DciA, DnaA and DnaX (with an organization typical of KH domain,¹⁹) overlap almost perfectly (Fig. 4b,c and Supplementary Fig. 4d).

Structural information about the CTD domain of VcDciA (corresponding to the residues 112 to 157) was deduced from SAXS data. The distance distribution function P(r) of full-length VcDciA calculated from the SAXS curve I(q) is highly dissymmetric, with an extension towards larger r-values (Fig. 4d). The maximal extension D_{max} in solution of VcDciA is of the order of 110 Å, as compared with D_{max} ≈ 50 Å for the structured part of the protein (residues 8-111) as determined using NMR. Three typical models are represented (inset in Fig. 4d). Our results strongly suggest that the CTD region of DciA is highly unfolded in solution, but local secondary structure elements are not excluded.

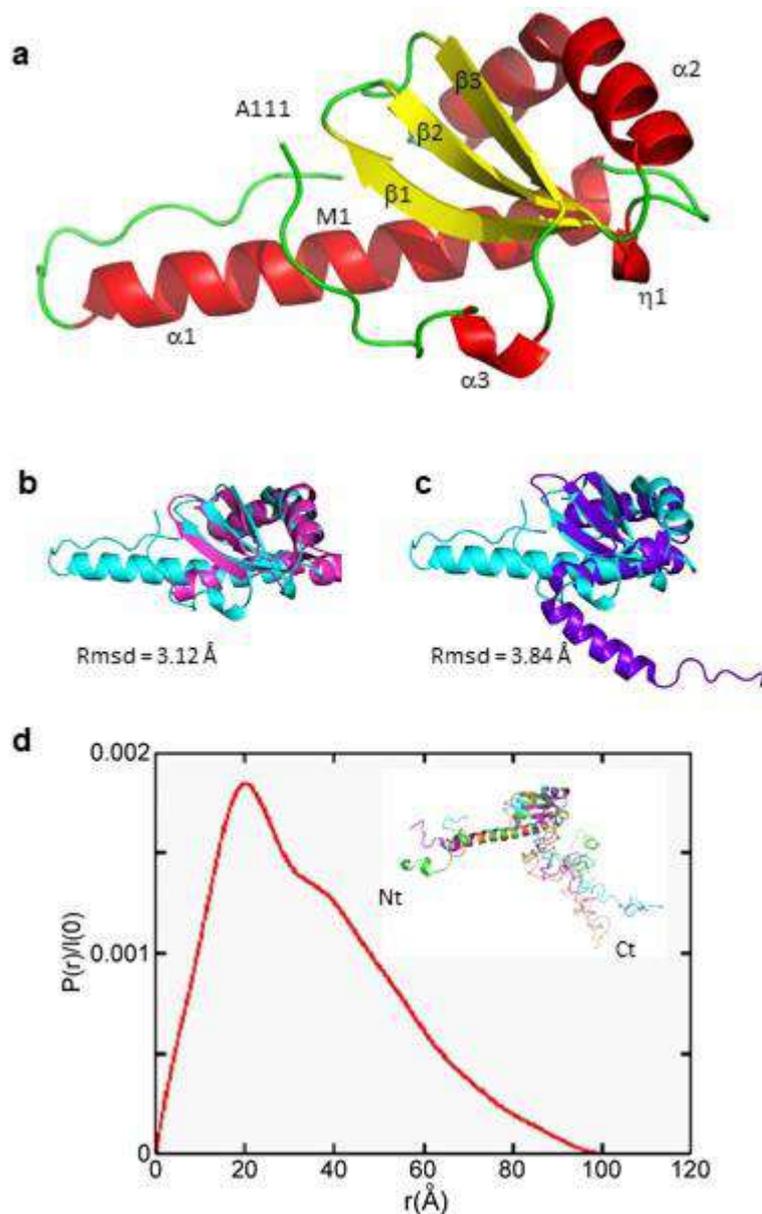


Fig. 4. The NTD of VcDciA shares structural homology with the DnaB-binding domain of DnaA. **a**, Representative structural model for VcDciA (residues 1 to 111), built from NMR backbone chemical shifts. Corresponding secondary structure elements are displayed in red for α -helices and yellow for β -strands. The unfolded regions are in green. **b**, Structural superimposition between the representative NMR-based structural model of VcDciA (residues 1-111, cyan) and homologous domains in the structures of *BsDnaA* (PDB 4TPS, chain B, pink). **c**, Same as in **b** except that the NMR-based structural model of VcDciA was superimposed with *EcDnaX* (PDB 2AYA, model 1, residues 1-96, purple). **d**, Structural properties of the full-length DciA by SAXS. Distance distribution function $P(r)$ of VcDciA resulting from SEC-SAXS analysis of the full-length protein. (Inset) Three superimposed models of the VcDciA full-length protein generated from the SAXS curve. Models of VcDciA were generated from the SAXS curve starting from the high-resolution NMR structure and modeling the missing CTD residues using the program DADIMODO (see [Material and Methods](#)^{14,50}). The 3 models display unfolded DciA CTD.

DciA stabilizes the helicase into a closed and planar hexamer. We also examined the influence of VcDciA on the structure of the helicase. In absence of ATP, the same proportion of VcDnaB oligomers of various sizes was detected by EM with or without VcDciA ($33 \pm 8/\text{su}$, [Fig. 2a top and Supplementary Fig. 2](#)). When VcDnaB was preincubated with ATP, however, the addition of VcDciA increased dramatically the amount of ring-shaped structures ($67 \pm 8/\text{su}$ without VcDciA vs. $150 \pm 12/\text{su}$ with DciA), suggesting that VcDciA recognizes pre-arranged hexamers and stabilizes them (compare [Fig. 2a bottom](#) and [Fig. 5a](#)). We analyzed the complexes formed between VcDnaB and VcDciA at a 2-fold mole/mole excess of DciA, in presence of ATP and Mg^{2+} , by SEC-SAXS ([Material and Methods](#)). We detected a stable VcDnaB•VcDciA complex at an early stage of the gel filtration chromatography ([Supplementary Fig. 5a](#)). The mass of this complex stabilized at a MW of 381 ± 10 kDa ([Fig. 5b](#)). Assuming an observed MW for the VcDnaB hexamer and VcDciA alone of 328 kDa and 20 kDa, respectively ([Fig. 2a and Fig. 4d](#)), the protein stoichiometry of the

complex is therefore estimated to be of 3 VcDciA molecules per helicase ring, in good agreement with SEC-MALS experiments (Supplementary Fig. 5b and Supplementary information) and with our SPR data (Fig. 3a).

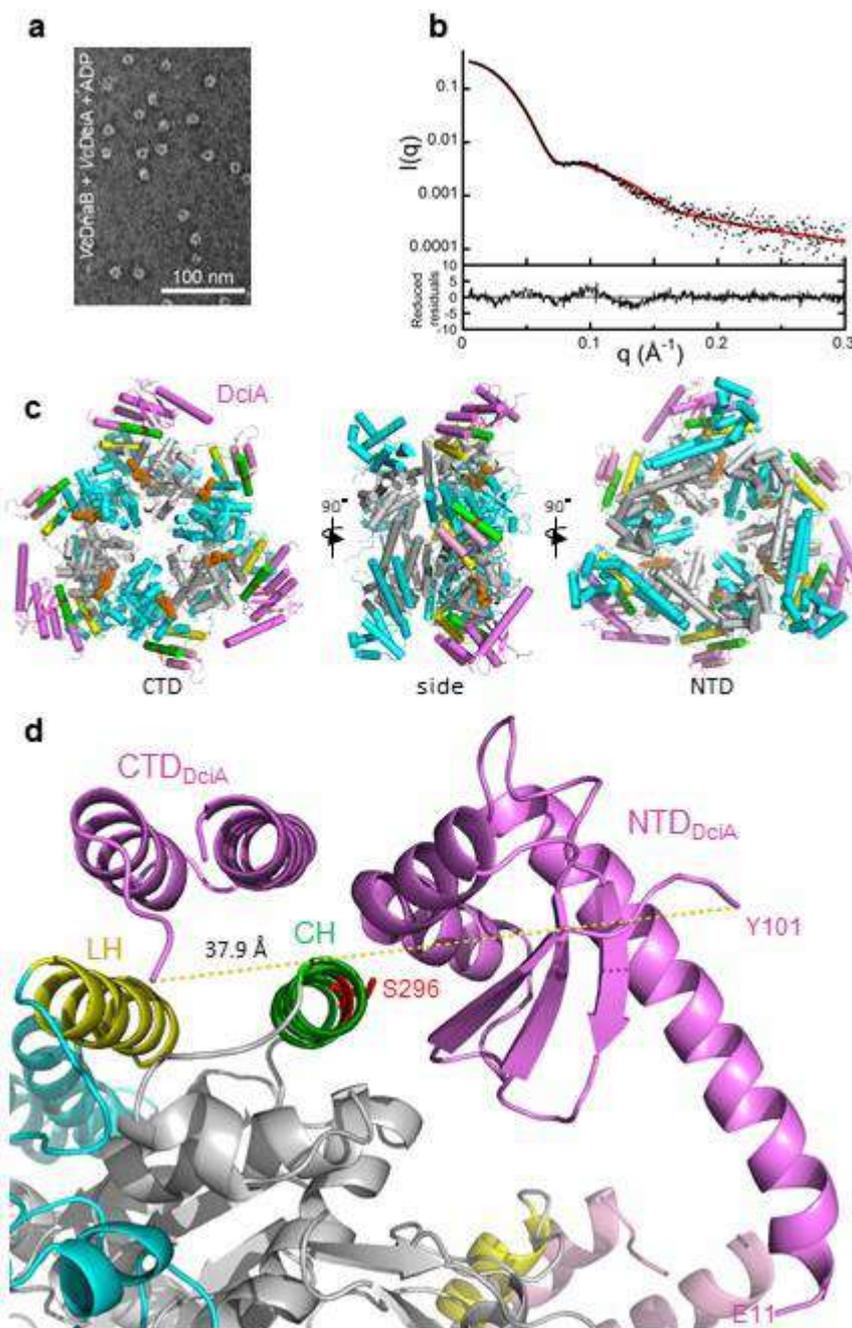


Fig. 5. VcDciA closes VcDnaB into a planar helicase ring. **a**, Electron microscopy negative staining of VcDnaB•VcDciA complex (DnaB was preincubated with ADP). The white bar represents a distance of 100 nm. **b**, Superimposition of the curve calculated on the all-atoms model of the VcDnaB•VcDciA complex, in presence of GDP•AlF₄ (red curve) against the experimental SEC-SAXS data (black dots). The corresponding distribution of reduced residuals, reflecting the variation between the two profiles, is presented at the bottom of the figure. The missing parts in the crystal structure were modelled using the program DADIMODO. **c**, 3 views of the VcDnaB•VcDciA complex crystal structure at 3.3 Å resolution showing the CTD (left), the side (middle) and the NTD of the helicase (right). The DnaB hexamer represented here is reconstituted by the rhombohedral (R32) space group symmetry of the crystal. VcDnaB subunits are represented in cyan or in grey, VcDciA domains are in pink. The position of the GDP•AlF₄ (brown dots) in the crystal structure is indicated. VcDciA interact with the periphery of the DnaB CTD ring. The LH and the helix containing the co-occurrence residue (CH) of VcDnaB are in yellow and green, respectively. The lateral chain of Ser296

(VcDnaB) is displayed in red. **d**, Zoom of the interface between VcDnaB and VcDciA showing the two helicase targets of DciA. DciA NTD interacts with the helicase through the kinked α -helix 2, while two helices from its CTD are positioned atop a scaffolding composed of the CH (in green) and the LH (in yellow) of two neighboring VcDnaB CTD. The dotted yellow line represents the 37.9 Å that separate the L100 and the nearest terminal end of CTD of VcDciA. The flexible linker that connects the NTD and the CTD of VcDnaB is not visible in the electron density.

To go deeper into the molecular relationship between DciA and DnaB and to decipher the interaction between the two proteins, we performed a crystallographic analysis of the VcDnaB•VcDciA complex. We solved a crystal structure of the complex in presence of GDP•AlF₄ by molecular replacement (Material and Methods) (Fig. 5c).

Data were corrected for anisotropy ([Material and Methods](#)) and the structure was refined at 3.3 Å resolution ([Supplementary Table 2](#)). The asymmetric unit of the crystal contained a dimer of DnaB interacting with 2 DciA. The hexamer of DnaB was reconstituted by the rhombohedral (R32) space group symmetry of the crystal.

The VcDnaB•VcDciA complex is arranged into a closed and planar hexamer ([Fig. 5c](#)). The DciA molecules are positioned on the outer periphery of the CTD ring of DnaB, leaving free the posterior surface of the helicase. The width of the internal chamber in the helicase complex is of 20 Å and the organization of the NTDs indicates that the helicase adopts a dilated conformation.

Although the CTD of DciA was shown to be unfolded in solution by SAXS ([Fig. 4c](#)), we identified two pairs of α -helices belonging to the CTD of two distinct DciA per dimer of DnaB, piling up above the fold consisting of the LH and the CH belonging to two neighboring DnaB subunits ([Fig. 5d](#)). The lateral chains of the CTD are not defined in the electron density map, preventing the attribution of these two helices. Interestingly, only a single globular DciA NTD (residues D10 to L100) was identified per dimer of DnaB within the crystal. It is noteworthy that the CH of VcDnaB, containing the co-occurrence serine 296 residue (see further below), is at the heart of the binding interface with VcDciA, since it interacts also with the kink of the α -helix 2 of VcDciA NTD ([Fig. 4a](#)). The electron density of the second DciA NTD could not be identified, reflecting a high degree of mobility, likely because of its lack of interaction with DnaB. We could not establish which DciA CTD is associated with the DnaB-bound DciA NTD since we could not visualize the 11 residues connecting the NTD and the CTD of DciA. Yet, the closest DciA CTD underneath the protruding heads of the helicase NTD is the most likely candidate ([Fig. 5d](#)). The clear 6/3 stoichiometry for the VcDnaB•VcDciA complex observed by SPR ([Fig. 3a](#)), SEC-MALS and SEC-SAXS analyses ([Supplementary Fig. 5b and Supplementary Table 3](#)) strongly suggests that the presence of the second DciA CTD identified in our crystal (in light pink in [Fig. 5d](#)) resulted from a crystallization artefact. It could have remained bound to DnaB due to close crystal-packing contacts present in this region that prevented its release. Finally, the 6/3 stoichiometry is also supported by fitting the experimental SAXS curve of the complex with the crystal structure consisting of 3 VcDciA per hexamer of VcDnaB. The agreement between the calculated curve and the experimental one is fairly good as seen on [Fig. 5b](#) ($\chi^2=1.77$, [Supplementary Table 3](#)).

Serine 296 is essential *in vivo* but neither for the loading nor for the translocation of the enzyme. Interestingly, we formerly isolated the serine 296 of VcDnaB, which is in a contact distance of VcDciA (Fig. 5d), in a phylogenetic study of DciA- and DnaC-helicases aimed at identifying critical helicase residues that were modified during the transition from a *dciA*- to a *dnaC*-associated species (Materials and Methods).

The initial analysis was performed with the replicative helicase protein sequences of the sole Enterobacteriales for this order of bacteria regroups closely related species that possess either DciA or DnaC. An alignment of replicative helicase protein sequences revealed that a unique residue strictly distinguishes helicases from *dnaC*- and *dciA*- species (Fig. 6a). This co-occurrence residue is located in a very conserved α helix, which we called CH (for co-occurrence helix), located next and anti-parallel to the linker helix LH (Fig. 5d). In *dciA*-species, the co-occurrence residue is always a serine whereas it is mostly a glycine in *dnaC*-species (Supplementary Fig. 6a). Two additional observations substantiate the relevance of this co-occurrence. Firstly, we identified two monophyletic branches of DnaC proteins in Enterobacteriales; each branch derives from an independent *dnaC* domestication event (Supplementary Fig. 6b), indicating that coincidental with the domestication of *dnaC*, a serine at the co-occurrence residue position was replaced by a glycine (Supplementary Fig. 6c). Secondly, the same type of analysis performed with DnaB sequences of Alteromonadales, which is the second identified bacterial order that regroups *dnaC*- and *dciA*-species¹², revealed that the co-occurrence residue discriminates *dnaC*- and *dciA*-containing species also. The co-occurrence residue is systematically a serine in *dciA*-containing species and another residue – mostly an asparagine – in the *dnaC*-containing species (Supplementary Fig. 6d).

To evaluate the relevance of the co-occurrence residue on the activity of the helicase *in vivo*, we undertook to construct a *VcdnaB*^{S296G} mutant. Our attempt to replace the WT copy of *VcdnaB* by *VcdnaB*^{S296G} by natural transformation failed (Materials and Methods). To verify that *VcDnaB*^{S296G} could not replace *VcDnaB*, we set up a two-step strategy (Fig. 6b left). We introduced in WT cells a plasmid carrying either *VcDnaB* (*B/B*), *VcDnaB*^{S296G} (*B/B*^{SG}) or nothing (*B/-*) (Materials and Methods, Fig. 6b right). Then, we introduced by natural transformation a piece of DNA carrying the kanamycin resistance gene bordered by sequences homologous to those found upstream and downstream of *dnaB* on the chromosome to induce the recombination-dependent replacement of the WT copy of *dnaB* by the kanamycin resistance gene (Materials and Methods). The transformation products were plated on selective medium. After 24h of incubation, the only transformants that gave rise to colonies were those that

contained a WT copy of *VcDnaB* on a plasmid, indicating that a *VcdnaB*^{S296G} mutant is unviable and that the residue at position 296 is critical for the function of the helicase *in vivo* (Fig. 6a).

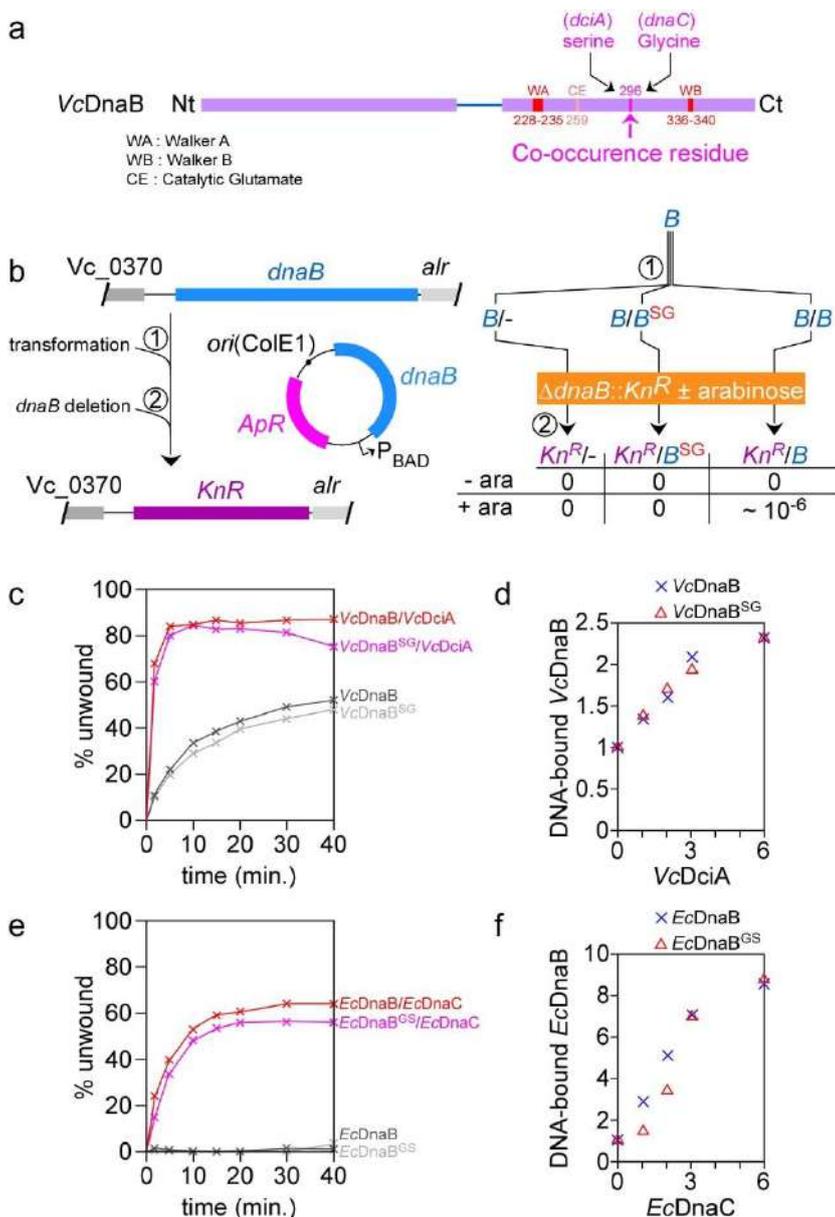


Fig. 6. The Co-occurrence residue modulates the binding of DnaC on replicative helicases.

a, Primary structure of *VcDnaB* displaying the NTD and the CTD of the helicase. Relevant motifs and residues are displayed. The position of the co-occurrence residue at position 296 is indicated. *In *dnaC* species, the co-occurrence residue is mostly a glycine. **b**, Design of the *in vivo* mutagenesis of *VcdnaB*. Briefly, WT cells were transformed with a plasmid carrying either nothing, the WT *VcdnaB* or the mutated *VcdnaB*^{SG} gene under the control of the arabinose promoter before the deletion of the chromosomal copy of *VcdnaB* was induced by natural transformation of these cells with a PCR fragment carrying a kanamycin resistance gene instead of *VcdnaB* (Material and Methods). The resulting cells were plated on selective medium (kanamycin) containing or not arabinose. The frequency of natural transformation is given for each condition (average of 3 independent experiments). **c**, Kinetics of unwinding performed with *VcDnaB* or *VcDnaB*^{SG} with or without *VcDciA* on the DNA branched substrate (Fig. 1c). **d**, SPR analyses of the stimulation of the loading of *VcDnaB* and *VcDnaB*^{SG} by *VcDciA* on DNA. *VcDnaB* (625 nM) was mixed with *VcDciA* at different *VcDnaB*/*VcDciA* ratios (in absence

of Mg). The proportion of DNA-bound helicase is plotted as a function of the amount of *VcDciA*. Values were arbitrarily normalized to 1 in absence of *VcDciA*. **(e and f)** Same as in C and D, except that the stimulation of *EcDnaB* and *EcDnaB*^{GS} helicases by *EcDnaC* on DNA was assessed.

We produced and purified mutant proteins of the replicative helicase of *E. coli* and *V. cholerae*, carrying a serine instead of a glycine at position 299 (*EcDnaB*^{G299S}) or a glycine instead of a serine at position 296 (*VcDnaB*^{S296G}), to assess the implication of the co-occurrence residue during the loading and the activation of the helicase *in vitro*. Surprisingly, we established through a DNA unwinding assay that the modification of the co-occurrence residue had neither impact on the helicase activity, on the capacity of the *VcDnaB*^{S296G} and *EcDnaB*^{G299S} to load themselves on

DNA, nor on the ability of *VcDciA* and *EcDnaC* to stimulate the loading of mutant helicases (Fig. 6c-f). We concluded that the nature of the co-occurrence residue neither affects the activity nor the translocation of the helicase *in vitro*.

Discussion

DciA specifies replicative helicase chaperone activity. DciA is not required to organize DnaB protomers into hexamers, nor is it necessary to assemble the helicase on DNA. Hence, DciA is not a helicase loader, *i.e.*, it is neither a “ring-maker” nor a “ring-breaker”. Instead, DciA appears to stabilize preformed DnaB hexamers into a closed and planar ring structure that seems at first glance incompatible with the loading of the helicase on DNA. Yet, DciA stimulates the loading of DnaB on DNA while being dispensable for the loading of its cognate replication helicase. We assayed replicative helicases of other *dciA*-species (*Pseudomonas aeruginosa*, *Azotobacter chroococcum* and *Deinococcus radiodurans*) and observed also that these helicases could self-load on DNA, in agreement with previous results²⁰, and that their loading was enhanced by DciA (data not shown). These imply that helicases of *dciA*- and *dnaC/l*-species are loaded according to different mechanisms. Indeed, the comparative analysis of *EcDnaB* (*DnaC*-species) and *VcDnaB* (*DciA*-species), two closely related helicases (79% identity) revealed intrinsic and major differences: first, a nucleotide is essential for the hexamerization of *VcDnaB*, but not for that of helicases of *DnaC/l* species like *E. coli* or *Geobacillus stearothermophilus*²⁻⁴. Second, free *VcDnaB* is opened and dynamic while free *EcDnaB* is sealed into a closed ring-like structure, implying that DciA stimulates the loading of its replicative helicase through a new mechanism.

The recent resolution at a molecular level of the *DnaB*•*DnaC* and *DnaB*• λ P complexes revealed that the helicase is opened by breakage of the protein motif composed of the LH and the CH between two neighboring subunits of the helicase^{21,22}. Interestingly, we observed that the free *VcDnaB* is dynamic due to the destabilization of a LH-CH protein motif, suggesting that the loading of the *DciA*-helicase requires the protein also to be opened between the LH and the CH. Hence, granted that the crack observed on free *VcDnaB* is not opened wide enough to accommodate DNA, the ability of *VcDnaB* (and other *DciA*-helicases) to self-load on DNA suggests that direct DNA:protein interactions contribute to the opening of the helicase as it was proposed for the loading of the Rho protein on RNA²³. If so, DciA could stimulate the loading of its helicase by remodeling the helicase into a conformation competent for an optimal DNA:protein interaction that would in turn convert the structure of the helicase into a loading-competent conformation.

DnaC and λP are helicase loaders to counterbalance their inhibition of the self-loading activity of DciA-helicases.

Phages such as T4 come with a complete set of replication proteins and mostly rely on their own proteins to propagate. Other depend on host factors to replicate their genome. For example, the lambda phage genome does not encode a replicative helicase but instead an accessory protein, λP, whose function is to hijack the host helicase: λP targets the host DnaB•DnaC complex to compete out DnaC in order to create a new helicase complex that will be brought to, and loaded on, the λ initiation complex²⁴. Other lambdoid phages may encode other accessory proteins to fulfill the function of λP, such as the phage helicase loader DnaC protein¹². In *E. coli*, the wide opening of the helicase is promoted by the intercalation of a portion of DnaC or λP between the LH and the CH of two neighboring subunits of the helicase^{21,22}. Given the opposite effect induced by DciA and DnaC/λP on their respective helicase, it seems likely that the association of phage helicase loaders such as DnaC or λP will finalize the hijacking of the host helicase by forcing DciA out while inducing the transition of the helicase into a loading competent conformation.

Following our hypothesis proposing that DciA-helicases load themselves through DNA:protein contacts, phage loaders would need not only to chase out DciA but also to hide the DNA contact zone of the helicase to prevent the helicase to be recruited at *oriC*. By comparing the structures of DnaB•DnaC and DnaB•λP with that of DnaB•DciA, the bottom part of the CTD of the helicase appears as a likely DNA contact zone since it is completely covered by DnaC and λP and fully accessible in the DnaB•DciA complex.

Hence, as a direct consequence of the inability of the now hijacked DciA-helicase to self-load on DNA, the phage loader ought to induce the wide opening of the helicase. In other words, the function of helicase loader specified by domesticated phage proteins like DnaC derives from the activity of its phage ancestor. We can only speculate that after domestication of a phage loader gene like *dnaC*, the replicative helicase lost progressively all or part of its ability to self-load on DNA, because the domesticated phage loader rendered this activity superfluous. It would be ironic that such a strategy, aimed at diverting a host protein from its cellular function, could have permitted the functional complementation of an accidental and otherwise lethal loss of DciA and might explain the frequent domestications of various phage loaders^{12,13}.

Beyond loading the helicase. DciA contains a KH fold found in two major proteins of replication initiation: in the NTD domain of DnaA and in the CTD domain of DnaX, near the polymerase-binding motif. Interestingly, *EcDnaA* interacts

also with the LH of DnaB²⁵. Hence, the KH folds of DciA, DnaA and DnaX could recognize and interact similarly with the helicase not only to recruit it on the initiation complex but also to transfer it to the clamp loader during replication initiation to ensure the formation of functional replisomes. Other features seem to tie DciA specifically with the initiation of replication. It is therefore tempting to associate intimately the function of DciA with this process.

Converging pieces of evidence support the hypothesis that the co-occurrence residue, and directly or indirectly DnaC and DciA, are critical during replication initiation *in vivo*. The characterization of a thermosensitive mutant of the *E. coli* replicative helicase, *EcDnaB252* was the first direct evidence. The mutation was identified in the codon of the co-occurrence residue (the glycine 299 is replaced by an aspartate). This mutation confers a thermosensitivity phenotype to the helicase for replication initiation²⁶. It is noteworthy that the *EcDnaB252* protein conserved full activity for primase recruitment, ssDNA binding, ATPase and helicase activity²⁷. The second evidence is indirect. It came from the failure to construct mutant cells in which the co-occurrence residue of *VcDnaB* was replaced by a glycine (similarly, we could not construct a *VcDnaB*^{S296D} mutant protein in which the serine was replaced by an aspartate (data not shown), despite the lack of impact of this residue switch on the loading and the translocation of the helicase *in vitro*. The last evidence comes from the implication of *EcDnaC* in the activation of the replicative helicase at *oriC*. In a replication initiation assay, *EcDnaB* remained stably associated with 3 *EcDnaC* molecules at an *oriC*-built initiation complex until primer synthesis²⁸. In complete contrast, we observed that *EcDnaC* is quickly and efficiently released from the DNA-bound *EcDnaB* when the helicase complex was loaded on random DNA, with or without ATP hydrolysis, enabling the activation of the helicase (data not shown), suggesting that the maintenance of the interaction between *EcDnaB* and *EcDnaC* at *oriC* is conditioned to the recruitment of the helicase complex by DnaA. It is therefore possible that beyond the loading of the helicase, either by chaperoning it in a conformation competent for the binding on DNA, or by opening it, DciA and DnaC may serve other purpose during replication initiation. Two prospective functions may come to mind. One could be to hold the helicase inactive until the formation of an active replisome at *oriC*. Another could be to coordinate the loading of two replicative helicases at *oriC* to trigger bidirectional replication of the chromosome.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

***V. cholerae* cells, plasmids, and media.** Three different media were used: LB (Bactotryptone 10 g/L, Yeast extract 5 g/L, NaCl 5 g/L), natural transformation medium (KH₂PO₄ 3 g/L, Na₂HPO₄ 6 g/L, NaCl 0.5 g/L, NH₄Cl 2 g/L, MgCl₂ 32 mM, CaCl₂ 5 mM), and minimal medium (KH₂PO₄ 3 g/L, Na₂HPO₄ 6 g/L, NaCl 0.5 g/L, Thiamine 5 µg/mL, D-fructose 0.4%, MgSO₄ 1 mM, CaCl₂ 0.1 mM). The *V. cholerae* strains used in this study derive from E7946 (wild type *V. cholerae* O1 El Tor). The plasmids containing the different alleles of *dnaB* were introduced in E7946 by conjugation²⁹. These plasmids were constructed as follow: the *oriT* region of RP4 was introduced at the *Xba* I – *Hin*D III sites of pBAD18 to create pREP725. An *Eco*R I – *Sac* I PCR fragment containing the WT *VcdnaB* (pREP728) and the mutated *VcdnaB*^{S296G} copy of the gene (pREP729) were introduced in pREP725 to place the expression of the helicase under the control of the Para promoter. Three *V. cholerae* strains were thus obtained: YAV366 (E7946/pREP725), YAV369 (E7946/pREP728) and YAV372 (E7946/pREP729).

Natural transformation. *Vibrio cholerae* cells were cultivated in LB medium at 37°C until an OD₅₅₀ of 0.1. Then, they were harvested and resuspended in an equivalent volume of natural transformation medium (KH₂PO₄ 3 g/l, Na₂HPO₄ 6 g/L, NaCl 0.5 g/L, NH₄Cl 2 g/L, MgCl₂ 32 mM, CaCl₂ 5 mM) and incubated for 24h at 30°C with chitin chips to induce cell competency. Between 200 to 500 ng of DNA (PCR amplification) was added to 1 ml of this solution and further incubated for 24h at 30°C. The cells were then plated on minimal medium (KH₂PO₄ 3g/l, Na₂HPO₄ 6g/l, NaCl 0.5g/l, Thiamine 5 µg/ml, D-fructose 0.4%, MgSO₄ 1 mM, CaCl₂ 0.1 mM) complemented with the appropriate antibiotic and incubated at 30°C. The plates were daily inspected for the appearance of new colonies during seven days.

Protein samples preparation. Cloning of *dnaB*, *dciA*, *dciA*^[1-111] and *dnaC* coding regions was performed using genomic DNA from *Vibrio cholerae* ATCC 39315 strain and *Escherichia coli* F11 strain as templates for PCR. Six histidine codons were added at the 3' end of each *dnaB* and *dnaC* construct, and at the 5' end of *dciA* constructs, during the PCR process. The fragments were inserted into the *Nde*I-*Xho*I sites of pET21 or pET29 vectors (Novagen), respectively for *dnaB* and *dciA/dnaC*. Site directed mutagenesis was performed using non-overlapping oligonucleotides phosphorylated in 5' (Eurofins), to construct the *VcDnaB*^{S296G} and the *EcDnaB*^{G299S} mutants.

Over-expression of the various constructs was performed in 800 ml 2xYT erlens in the BL21(DE3)Gold strain o/n at 15°C, after induction with 0.5 mM IPTG (Sigma). Cells were harvested by centrifugation, resuspended in buffer A (200 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl (pH 7.5)) for all of the constructs and stored at -20°C. Cell lysis was completed by sonication (probe-tip sonicator Branson). After centrifugation at 20,000 g and 8°C for 30 min, the His-tagged proteins were purified on a Ni-NTA column (Qiagen Inc.), eluted with imidazole in buffer A but complemented by 1 mM ATP + 3 mM MgCl₂ in the case of all the helicases. *VcDciA* or *EcDnaC* were then loaded onto a Heparin column in a phosphate buffer [NH₂PO₄ 20 mM, NaCl 100 mM (pH 5.8)] and eluted with a gradient of NaCl (from 100 mM to 1 M). The elution fractions centered at 500 and 250 mM NaCl respectively for *VcDciA* and *EcDnaC* were selected. The helicases were loaded onto a Superdex TM200 column (GE), equilibrated against 100 mM NaCl, 1 mM ATP, 3 mM MgCl₂, 20 mM Tris-HCl (pH 8.8). Their purification was completed with a MonoQ column (Amersham Pharmacia Biotech) in Tris-HCl (20 mM, pH 8.8) and a gradient of NaCl (from 100 mM to 1 M). The elution fractions centered at 450 mM NaCl were selected. The proteins were desalted up to 200 mM NaCl and concentrated using Vivaspın 5,000 or 30,000 nominal molecular weight limit cut-off (respectively for *DciA/DnaC* and *DnaB*) centrifugal concentrators (Vivascience), aliquoted, flash frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C, or dialyzed in a 50% (vol/vol) glycerol buffer for storage at -20°C.

NMR experiments. Production of ¹⁵N and ¹³C labeled *VcDciA*^[1-111] was obtained using the same protocol as described above except that the cellular culture was performed in a minimal medium supplemented with ¹⁵N ammonium chloride and ¹³C glucose (Eurisotop)³⁰. NMR experiments were carried out on a Bruker Avancell-700 MHz spectrometer. For assignment experiments, purified ¹⁵N-¹³C *VcDciA*^[1-111] was concentrated up to 0.9 mM, in the NMR buffer (20 mM phosphate buffer (NH₂PO₄) pH 5.8, NaCl 50 mM, 2 μM EDTA, 0.2 mM DSS, 0.1 mg/ml NaN₃, 10% D₂O). Data for assignment of the backbone resonances were collected at 293 K using standard ¹H-¹⁵N HSQC, ¹⁵N-edited NOESY-HSQC, TOCSY-HSQC, HBHA(CO)NH, HN(CA)N, HNCO, HNCA, HN(CO)CA, HN(CA)CO and CBCA(CO)NH experiments. Proton chemical shifts (in ppm) were referenced relative to internal DSS and ¹⁵N and ¹³C references were set indirectly relative to DSS using frequency ratios³¹. NMR data were processed using Topspin (Bruker) and analyzed using SPARKY 3 (T.D. Goddard and D.G. Kneller, UCSF).

Chemical shift indices and structural model of VcDciA^[1-111] from NMR data. Chemical shift indices were calculated for VcDciA^[1-111] based on comparison of the chemical shift values obtained from NMR experiments with random coil chemical shifts calculated with sequence correction factors, temperature and pH corrections and GGXGG-based neighbor correction for glycines³². Structural models of VcDciA^[1-111] were computed with CS-ROSETTA version 1.01³³. First, the MFR program from NMRpipe³⁴ was used to search a structural database for best matched fragments based on the protein backbone ¹⁵N, ¹³C, ¹³CA, ¹³CB, ¹HN and ¹HA chemical shifts of VcDciA^[1-111]. Then the ROSETTA 3.8 software was used to conduct protein structure prediction by fragment assembly and full-atom relaxation. 5844 models were generated and sorted by ROSETTA full atom score. The 200 full-atom models with best ROSETTA score were rescored by correcting ROSETTA scores using chemical shift scores obtained by comparing the experimental chemical shifts with the chemical shifts predicted by SPARTA³⁵ for each model. The best model after rescoring was chosen as a representative NMR model and used for co-evolutionary comparisons with other structures in the PDB. A preliminary model obtained from 1000 models generated with CS-ROSETTA using 97% of the finally assigned chemical shifts was used for SAXS data interpretation and for X-ray structure molecular replacement. The two models differ mostly in the NTD and CTD extremities (which display little secondary structure) and have only 1.7 Å RMS deviation over the core 88 residues (positions 10 to 97).

Structural comparison with the PDB and remote homology search. The DALI webserver³⁶ was used to query the NMR-based structural model of VcDciA^[1-111] against the whole Protein Data Bank (PDB). The HHpred webserver^{17,18} with 5 iterations of HHblits against the uniprot20_2016_02 for query profile generation and all other parameters set to their default values was used to search for homologs of the full-length VcDciA sequence in the PDB database (PDB_mmCIF70_28_Jul) and the Pfam database (Pfam-A_v31.0).

Helicase assays. Forked DNA substrates were built by the annealing of two oligonucleotides (see sequences in [Supplementary Table 1](#)): oso3 with oso16 for fo3-16. In case of streptavidin (SA) blocking, SA from Sigma was added to biotinylated fork with an excess of four. DNA substrates (40 fmol) were then incubated in 10 µl at 37°C with indicated amounts of proteins in buffer A (Hepes 50 mM (pH7), NaCl 150 mM, ATP 1 mM, MgCl₂ 10 mM, DTT 1 mM, glycerol 10%) supplemented with oligonucleotide oso7 ([Supplementary Table 1](#)) at 2 mM. This oligonucleotide is

partially complementary to *oso3* and prevents new annealing after helicase activity. Reactions were stopped by addition of 150 mM EDTA and 1% SDS and incubated for 30 min with 1 µg of proteinase K (ThermoFisher). Reaction products were then resolved by electrophoresis on a 8% native polyacrylamide gel in Tris-borate-EDTA (TBE 1X) buffer, and revealed by the fusion FX camera (Vilbert Loumat). Fork opening were quantified by ImageJ.

Surface plasmon resonance analysis. Surface plasmon resonance (SPR) was measured using a Proteon XPR36 instrument (Bio-Rad). The measurements were performed at 30°C in a PBS buffer (Bio-Rad) added with 0.01 % of Tween 20 (PBST) and with or without ATP 0.5 mM. NLC sensor chips (Bio-Rad) were used to immobilize the oligonucleotides *Oso13* or *Oso15* ([Supplementary Table 1](#)) through their biotin-tag. For immobilization, DNA were diluted in PBST and attached to the chip to obtain 50 RU in different orientations (3' free for *Oso13* or 5' free for *Oso15*). For the observation of kinetic data, two different kinds of experiments were performed. In experiments where loading and translocation were coupled, proteins were injected in PBST with 0.5 mM ATP and 10 mM MgCl₂ at 50 µl/min during 240 sec, and dissociation was run during 900 sec. In experiments where loading and translocation of the helicase on DNA was uncoupled, proteins were injected in PBST with 0.5 mM ATP during same duration, and the 900 sec dissociation was followed by injection of PBST with ATP 0.5 mM plus MgCl₂ 10 mM during 459 sec. In all experiments, the proteins were injected at different concentrations and different molar ratios, as indicated in the Results section. After each interaction test, the chip was regenerated using 0.5% of SDS. After corrected by subtraction of the uncoated reference channel, the sensorgrams were analyzed and compared.

Phylogenetic analyses. An alignment of proteins (a crude alignment generated using the program ClustalW and refined by hand) was fed into PhyLM (v. 3.0) and 100 bootstrap replicates were generated for each analysis³⁷. A consensus tree was eventually obtained by running the program CONSENSE and fed as an input tree into PhyML. Significant bootstrap scores (arbitrarily above 70 %) of key nodes are indicated³⁸.

Crystal structures. Purified VcDnaB was preincubated for 10 min at 4°C at a concentration of 0.115 mM (monomer) with 2 mM GDP + 5 mM NaF + 0.5 mM AlF₄ + 5 mM MgCl₂ for direct crystallization and for co-crystallization with

VcDciA added at a final concentration of 0.3 mM for a second step of incubation. Native protein crystals were grown in seeding drops by mixing the proteins with reservoir solution in a 1:1 ratio. Crystals of VcDnaB appeared after 20 days at 18°C in 0.1M MES (pH6.0) + 10%(v/v) MPD (reagent 51 from The MPB screen from Nextal). Crystals of the VcDnaB•VcDciA complex appeared after 5 days at 18°C in 0.1 M sodium acetate (pH 5.6) + 0.6 M potassium/sodium tartrate (reagent 76 from The Anion screen from Qiagen). Glycerol cryo-protected crystals (two steps at 15 and 30%) were flash frozen in liquid nitrogen.

Diffraction data and refinement statistics are given in [Supplementary Table 2](#). Crystallographic data were collected at the PROXIMA-1 and PROXIMA-2 beamlines from Synchrotron SOLEIL (Saint-Aubin, France) and processed with XDS³⁹ through XDSME⁴⁰. Diffraction anisotropy was corrected using the STARANISO server (<http://staraniso.globalphasing.org>). The VcDnaB•VcDciA•GDP•AlF₄ complex crystal structure was solved by molecular replacement with the MOLREP program⁴¹ using the X-ray structures of the NTD [25-169] and CTD [200-461] isolated domains of *Aquifex aeolicus* DnaB as search models (PDB ID 4NMN). Significant additional density allowed manual building of the CTD isolated domains of VcDciA and manual positioning of the NTD, using the NMR structure of VcDciA^[1-111] solved in this study. The VcDnaB•GDP •AlF₄ structure was identically solved by molecular replacement using a previously refined model from the VcDnaB•VcDciA complex. Iterative improvements of the initial model were obtained by normal-mode refinement using iMODFIT⁴² in triclinic expanded electron-density maps calculated after refinement with the BUSTER program⁴³. All model refinements were conducted with the BUSTER program using TLS and strong non-crystallographic symmetry restraints⁴⁴ keeping the CTD and NTD separated. The models were corrected and completed using COOT⁴⁵.

Negative staining electron microscopy. VcDnaB solution were diluted in salt buffer (Tris-HCl 10 mM pH 8, 200 mM NaCl) at 1.3 μM in absence or presence of ATP 250 μM. One μl of DnaB solutions was mixed with 130 nM of DciA or/and 250 μM of NTP (ATP, AMP-PNP or ADP) or/and 30 nM DNA (50-mer) during 2 min at 4°C in final buffer (Tris-HCl 10 mM (pH8), NaCl 70 mM). 5 μl of the different mixtures were adsorbed onto 300 mesh copper grids coated with a collodion film covered by a thin carbon film, activated by glow-discharge. After 1 min, grids were washed with aqueous 2% w/vol uranyl acetate (Merck, France) and then dried with ashless filter paper (VWR, France).

Transmission electron microscopy (TEM) observations were carried out with a Zeiss 912AB transmission electron

microscope in filtered zero loss mode. Electron micrographs were obtained using a Tengra digital camera (Olympus) and Soft Imaging Software system (iTEM). The helicase surface density was estimated by counting the amount of particles per surface unit (SU) of 770 nm X 770 nm. The results presented here correspond to the average of 50 independent such analyses.

Small angle X-ray scattering. Proteins and protein complexes were prepared as described for the crystallization experiments, except that VcDnaB was here preincubated with various nucleotides: ATP, ADP or AMP-PNP before injection or before incubation with VcDciA.

SAXS experiments were performed on the SWING beamline at the synchrotron SOLEIL (St-Aubin, France). The sample-to-detector (Eiger 4M Dectris) distance was set to 1789 mm and the wavelength λ to 1.0 Å, allowing useful data collection over the momentum transfer range of $0.005\text{Å}^{-1} < q < 0.5\text{Å}^{-1}$. SAXS data were collected directly after elution of the proteins or protein complexes through the on-line size-exclusion high-performance liquid chromatography column (Superdex Increase 200 10/300, GE Healthcare) equilibrated in Tris-HCl 20 mM (pH8.8), NaCl 100 mM, with or without ATP 1 mM. 100 µl of protein samples were injected at 15°C at an initial concentration close to 10 mg/ml. The flow rate was 0.5 ml/min, frame duration was 2.99 sec and the dead time between frames was 0.01 sec. Scattering of the elution buffer before void volume was recorded and subtracted from all protein scattering curves. The scattered intensities were displayed on an absolute scale using the scattering by water. For each frame, the protein concentration (below 1 mg/mL at the top of elution peak) was estimated from UV absorption at 280 nm using a spectrophotometer located immediately upstream of the SAXS measuring cell. Data were first analyzed using Foxtrot, the Swing in-house software, and then using the US-SOMO HPLC module⁴⁶. This program provided for each SAXS frame the values of the scattering intensity $I(0)$ and of the radius of gyration R_g by applying the Guinier analysis together with a calculation of the approximate molar mass using the Rambo and Tainer approach⁴⁷. Identical frames under the main elution peak were selected using Cormap⁴⁸ and averaged for further analysis. Finally the distance distribution functions $P(r)$ were calculated from the averaged scattering curves using the GNOM program from the ATSAS suite⁴⁹. The determination of all-atoms models for VcDnaB•ATP and VcDciA from the SAXS curves was performed using the program DADIMODO available at Soleil (^{14,15}

<https://dadimodo.synchrotron-soleil.fr>, Roudenko O., Thureau A. & Pérez J.)). This program starts from the atomic

structure obtained using crystallography or NMR and models and refines the missing parts by adjusting the calculated curve on the model to the experimental curve. All the SAXS values are given in Table S3.

Accession Numbers

The entry code in the Biological Magnetic Resonance Data Bank (BMRB) for the structure of VcDciA^[1-111] is 27689.

The PDB accession numbers for the structures reported in this paper are 6T66 (VcDnaB•GDP•AlF₄) and 6T67 (VcDnaB•VcDciA•GDP•AlF₄). The molecular models and experimental SAXS data have been deposited on SASBDB (Small Angle Scattering Biological Data Bank, <http://www.sasbdb.org/aboutSASBDB/>) under the SAS codes: SASDGP5 (VcDciA), SASDGQ5 (VcDnaB•ATP) and SASDGR5 (VcDnaB•VcDciA•ATP).

Additional Information

Supplemental information includes 6 Figures, 3 Tables and a supplementary Material and Methods.

Acknowledgments

X-ray diffraction and SAXS data were collected at Synchrotron SOLEIL (Saint-Aubin, France; beamlines Proxima 1, Proxima 2 and SWING). We thank the beamline staffs for assistance and advice during data collection. This work has benefited from the expertise of the Macromolecular interactions measurements Platform (PIM) of I2BC (Gif-sur-Yvette, France) for the SPR and SEC-MALS experiments; we thank Michel Desmadril for help and discussions. We are thankful to Julien Bischerour, Isabelle Vallet-Gely and Frederic Boccard for critical reading of the manuscript and helpful comments.

Funding

This work was supported by the French Infrastructure for Integrated Structural Biology (FRISBI) ANR-10-INBS-05, by funds from the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) and by grants of the Region Ile de France. YA was supported by a Ph.D fellowship from the DIM Malinf program from the Conseil Régional d'Ile de France.

Author contributions

J.-L.F., and S.Q.-C. conceived this study; A.H., Y.A., and S.Q.-C. performed the cloning and mutagenesis; C.C., and S.Q.-C. purified and crystallised the proteins; S.M., and M.A.-N. performed the SPR and biochemical assays; H.W., I.G.-L.S., and P.L. performed the X-ray structure determinations and refinements; J.A., and F.O. performed the NMR structural study; E.L.C., and S.B. performed the electron microscopy experiments; D.D. performed the SEC-SAXS experiments; C.V. performed the SEC-MALS experiments; J.-L.F. performed the phylogenetic analyses; Y.A., C.P., and J.-L.F. performed the *in vivo* experiments; J.-L.F., S.Q.-C., and S.M. wrote the paper with input from all authors.

References

1. Singleton, M.R., Dillingham, M.S. & Wigley, D.B. Structure and mechanism of helicases and nucleic acid translocases. *Annu Rev Biochem* **76**, 23-50 (2007).
2. Strycharska, M.S. et al. Nucleotide and partner-protein control of bacterial replicative helicase structure and function. *Mol Cell* **52**, 844-54 (2013).
3. Bailey, S., Eliason, W.K. & Steitz, T.A. The crystal structure of the *Thermus aquaticus* DnaB helicase monomer. *Nucleic Acids Res* **35**, 4728-36 (2007).
4. Lo, Y.H. et al. The crystal structure of a replicative hexameric helicase DnaC and its complex with single-stranded DNA. *Nucleic Acids Res* **37**, 804-14 (2009).
5. Bailey, S., Eliason, W.K. & Steitz, T.A. Structure of hexameric DnaB helicase and its complex with a domain of DnaG primase. *Science* **318**, 459-63 (2007).
6. Barcena, M. et al. The DnaB.DnaC complex: a structure based on dimers assembled around an occluded channel. *EMBO J* **20**, 1462-8 (2001).
7. Deegan, T.D. & Diffley, J.F. MCM: one ring to rule them all. *Curr Opin Struct Biol* **37**, 145-51 (2016).
8. Velten, M. et al. A two-protein strategy for the functional loading of a cellular replicative DNA helicase. *Mol Cell* **11**, 1009-20 (2003).
9. Davey, M.J. & O'Donnell, M. Replicative helicase loaders: ring breakers and ring makers. *Curr Biol* **13**, R594-6 (2003).
10. Arias-Palomo, E., O'Shea, V.L., Hood, I.V. & Berger, J.M. The bacterial DnaC helicase loader is a DnaB ring breaker. *Cell* **153**, 438-48 (2013).
11. Skarstad, K. & Katayama, T. Regulating DNA replication in bacteria. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **5**, a012922 (2013).
12. Brezellec, P., Vallet-Gely, I., Possoz, C., Quevillon-Cheruel, S. & Ferat, J.L. DciA is an ancestral replicative helicase operator essential for bacterial replication initiation. *Nat Commun* **7**, 13271 (2016).
13. Brezellec, P. et al. Domestication of Lambda Phage Genes into a Putative Third Type of Replicative Helicase Matchmaker. *Genome Biol Evol* **9**, 1561-1566 (2017).
14. G. Evrard, F.M., F. Bontems, C. Sizun and J. Perez. DADIMODO: a program for refining the structure of multidomain proteins and complexes against small-angle scattering data and NMR-derived restraints. *J Appl. Crystallogr.* **44**(2011).

15. Olga Rudenko, A.T., and Javier Perez. Evolutionary refinement of the 3D structure of multi-domain protein complexes from small angle X-ray scattering data. *In Proceedings of the Genetic and Evolutionary Computation Conference Companion (GECCO '19)* Manuel López-Ibáñez (Ed.), 401-402 (2019).
16. Koonin, E.V. DnaC protein contains a modified ATP-binding motif and belongs to a novel family of ATPases including also DnaA. *Nucleic Acids Res* **20**, 1997 (1992).
17. Zimmermann, L. et al. A Completely Reimplemented MPI Bioinformatics Toolkit with a New HHpred Server at its Core. *J Mol Biol* **430**, 2237-2243 (2018).
18. Soding, J. Protein homology detection by HMM-HMM comparison. *Bioinformatics* **21**, 951-60 (2005).
19. Grishin, N.V. KH domain: one motif, two folds. *Nucleic Acids Res* **29**, 638-43 (2001).
20. Caspi, R. et al. A broad host range replicon with different requirements for replication initiation in three bacterial species. *Embo j* **20**, 3262-71 (2001).
21. Arias-Palomo, E., Puri, N., O'Shea Murray, V.L., Yan, Q. & Berger, J.M. Physical Basis for the Loading of a Bacterial Replicative Helicase onto DNA. *Mol Cell* (2019).
22. Chase, J. et al. Mechanisms of opening and closing of the bacterial replicative helicase. *Elife* **7**(2018).
23. Skordalakes, E. & Berger, J.M. Structure of the Rho transcription terminator: mechanism of mRNA recognition and helicase loading. *Cell* **114**, 135-46 (2003).
24. Mallory, J.B., Alfano, C. & McMacken, R. Host virus interactions in the initiation of bacteriophage lambda DNA replication. Recruitment of Escherichia coli DnaB helicase by lambda P replication protein. *J Biol Chem* **265**, 13297-307 (1990).
25. Seitz, H., Weigel, C. & Messer, W. The interaction domains of the DnaA and DnaB replication proteins of Escherichia coli. *Mol Microbiol* **37**, 1270-9 (2000).
26. Zyskind, J.W. & Smith, D.W. NOVEL Escherichia coli dnaB mutant: direct involvement of the dnaB252 gene product in the synthesis of an origin-ribonucleic acid species during initiation of a round of deoxyribonucleic acid replication. *J Bacteriol* **129**, 1476-86 (1977).
27. Saluja, D. & Godson, G.N. Biochemical characterization of Escherichia coli temperature-sensitive dnaB mutants dnaB8, dnaB252, dnaB70, dnaB43, and dnaB454. *J Bacteriol* **177**, 1104-11 (1995).
28. Makowska-Grzyska, M. & Kaguni, J.M. Primase directs the release of DnaC from DnaB. *Mol Cell* **37**, 90-101 (2010).
29. Demarre, G. et al. A new family of mobilizable suicide plasmids based on broad host range R388 plasmid (IncW) and RP4 plasmid (IncPalpha) conjugative machineries and their cognate Escherichia coli host strains. *Res Microbiol* **156**, 245-55 (2005).
30. Quevillon-Cheruel, S. et al. Cloning, production, and purification of proteins for a medium-scale structural genomics project. *Methods Mol Biol* **363**, 21-37 (2007).
31. Wishart, D.S. & Nip, A.M. Protein chemical shift analysis: a practical guide. *Biochem Cell Biol* **76**, 153-63 (1998).
32. Kjaergaard, M. & Poulsen, F.M. Sequence correction of random coil chemical shifts: correlation between neighbor correction factors and changes in the Ramachandran distribution. *J Biomol NMR* **50**, 157-65 (2011).
33. Shen, Y. et al. Consistent blind protein structure generation from NMR chemical shift data. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 4685-90 (2008).
34. Delaglio, F. et al. NMRPipe: a multidimensional spectral processing system based on UNIX pipes. *J Biomol NMR* **6**, 277-93 (1995).
35. Shen, Y. & Bax, A. Protein backbone chemical shifts predicted from searching a database for torsion angle and sequence homology. *J Biomol NMR* **38**, 289-302 (2007).
36. Holm, L. & Laakso, L.M. Dali server update. *Nucleic Acids Res* **44**, W351-5 (2016).
37. Guindon, S. & Gascuel, O. A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Syst Biol* **52**, 696-704 (2003).
38. Felsenstein, J. PHYLIP (Phylogeny Inference Package) version 3.6. . *Department of Genome Sciences, University of Washington, Seattle, Distributed by the author.* (2004).
39. Kabsch, W. XDS. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **66**, 125-32 (2010).
40. Legrand, P. XDSME: XDS Made Easier *GitHub repository*, <https://github.com/legrandp/xdsme> (2017).
41. Vagin, A. & Teplyakov, A. Molecular replacement with MOLREP. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **66**, 22-5 (2010).
42. Lopez-Blanco, J.R. & Chacon, P. iMODFIT: efficient and robust flexible fitting based on vibrational analysis in internal coordinates. *J Struct Biol* **184**, 261-70 (2013).
43. Bricogne, G. et al. BUSTER version 2.1.3. . *Cambridge, United Kingdom: Global Phasing Ltd.* (2017).

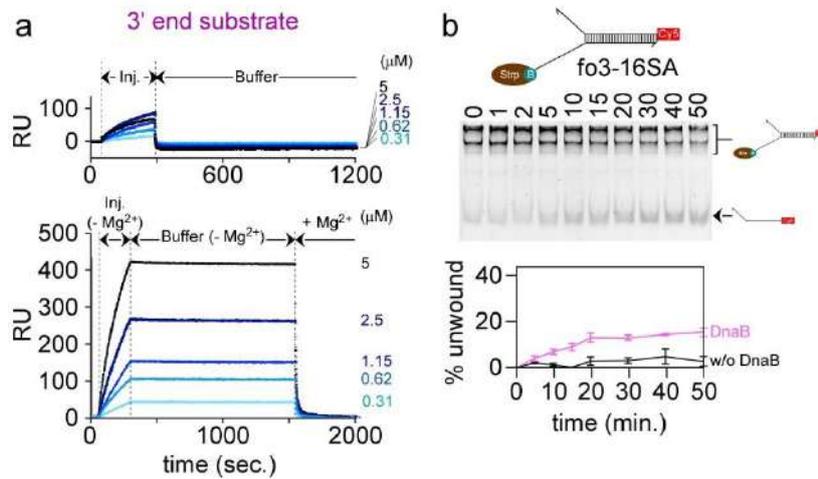
44. Smart, O.S. et al. Exploiting structure similarity in refinement: automated NCS and target-structure restraints in BUSTER. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **68**, 368-80 (2012).
45. Emsley, P., Lohkamp, B., Scott, W.G. & Cowtan, K. Features and development of Coot. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **66**, 486-501 (2010).
46. Brookes, E., Vachette, P., Rocco, M. & Perez, J. US-SOMO HPLC-SAXS module: dealing with capillary fouling and extraction of pure component patterns from poorly resolved SEC-SAXS data. *J Appl Crystallogr* **49**, 1827-1841 (2016).
47. Rambo, R.P. & Tainer, J.A. Accurate assessment of mass, models and resolution by small-angle scattering. *Nature* **496**, 477-81 (2013).
48. Franke, D., Jeffries, C.M. & Svergun, D.I. Correlation Map, a goodness-of-fit test for one-dimensional X-ray scattering spectra. *Nat Methods* **12**, 419-22 (2015).
49. Franke, D. et al. ATSAS 2.8: a comprehensive data analysis suite for small-angle scattering from macromolecular solutions. *J Appl Crystallogr* **50**, 1212-1225 (2017).
50. Mareuil, F. et al. A simple genetic algorithm for the optimization of multidomain protein homology models driven by NMR residual dipolar coupling and small angle X-ray scattering data. *Eur Biophys J* **37**, 95-104 (2007).

Supplementary Information

Determination of the absolute molar masses of VcDciA, VcDnaB and the VcDciA•VcDnaB complexes by SEC-MALS.

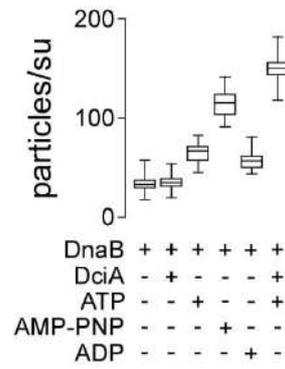
Size exclusion chromatography coupled with multi-angle light scattering (SEC-MALS) experiments were performed on the PIM platform of I2BC, Gif-sur-Yvette, France, using a high-performance liquid chromatography (HPLC) system (Shimadzu, Kyoto, Japan) equipped with static light scattering (mini DAWN TREOS; Wyatt Technology, Goleta, CA), refractive index (Optilab T-rEX; Wyatt Technology), and ultraviolet (UV) detectors (SPD-M20A; Shimadzu). Samples were injected at a final concentration of 2 mg/ml on a Superdex 200 10/300 Increase column (GE Healthcare) equilibrated in buffer Tris-HCl 20 mM (pH 8.8), NaCl 100 mM, ATP 1 mM, at 0.5 mL/min and 8°C. The eluted fractions are deposited on SDS-PAGE to visualize by Coomassie staining their protein content in order to validate the reconstitution of the VcDnaB•VcDciA complexes in presence of AMP-PNP and ADP. The absolute molar masses of the proteins were calculated using version 6.1 of the ASTRA software (Wyatt Technology) and a refractive index increment (dn/dc) value of $0.183 \text{ mL}\cdot\text{g}^{-1}$. The hydrodynamic radii were determined using the quasi-elastic light scattering (QELS) module (Wyatt Technology). Protein stoichiometry determinations of the DnaB/DciA complexes (at a 1:2 ratio) in presence of ATP, AMP-PNP or ADP (1 mM final in the DnaB samples for 10 min at 4°C before adding DciA) were performed by SEC-MALS using the “UV extinction from RI peak” method ¹ and the protein conjugate method ². The UV280 extinction coefficients of the peaks are extracted from the SEC-MALS data and compared to the predicted extinction coefficients for the complex at different ratios, which are calculated from the amino acid sequences.

Figure S1



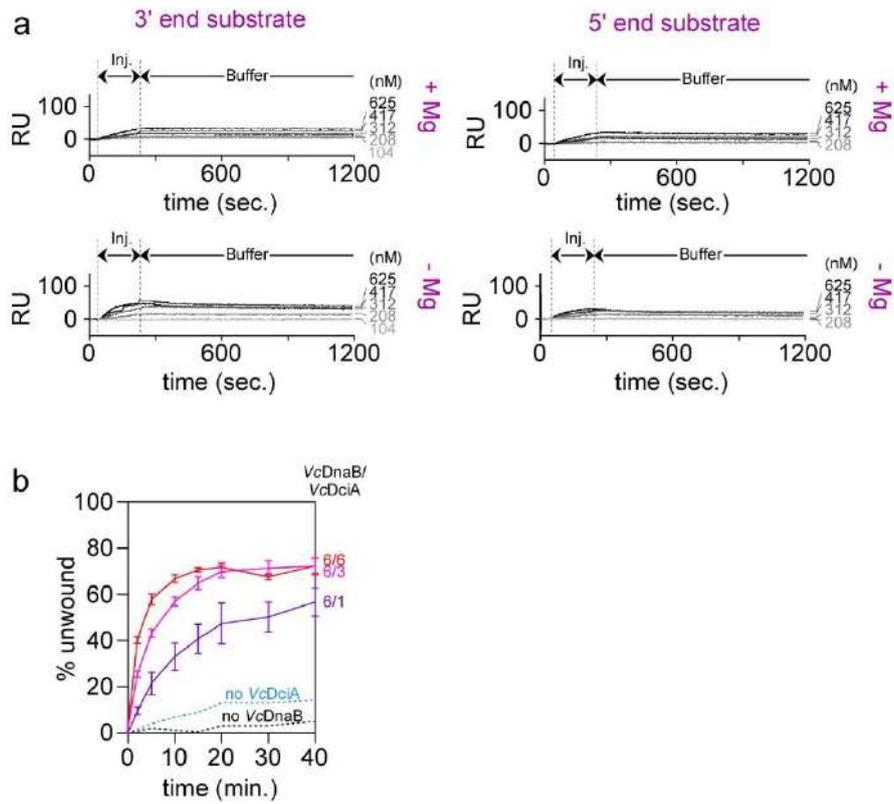
Supplementary Fig. 1. Loading of VcDnaB on 3' end substrate by SPR and translocase activity on 5' blocked fork. a, The ssDNA molecule was attached to the matrix through its 5' biotinylated extremity, leaving a 3' end accessible. SPR experiments were carried out in presence of ATP with (top) or without MgCl₂ (bottom). In this last condition, after a first dissociation in the same buffer (Buf. -Mg²⁺), a second dissociation is performed in presence of ATP plus MgCl₂ (+Mg²⁺), allowing helicase translocation and its release from the DNA. Various concentrations of VcDnaB were assayed from 312 nM (light blue) to 5 μM (black). **b,** The branched DNA substrate used in this experiment is represented. The 25-nucleotide long hybrid was prolonged with two sections of single-stranded DNA (25 and 50 nucleotide long). A Cy5 fluorophore was added at one 5' end, while a biotin was linked to the other 5' end and was trapped with Streptavidin (fo3-16SA), preventing the threading but not the loading of the helicase on DNA. The helicase assay was performed with VcDnaB at 625 nM. Samples were taken over time and ran on a native gel.

Figure S2

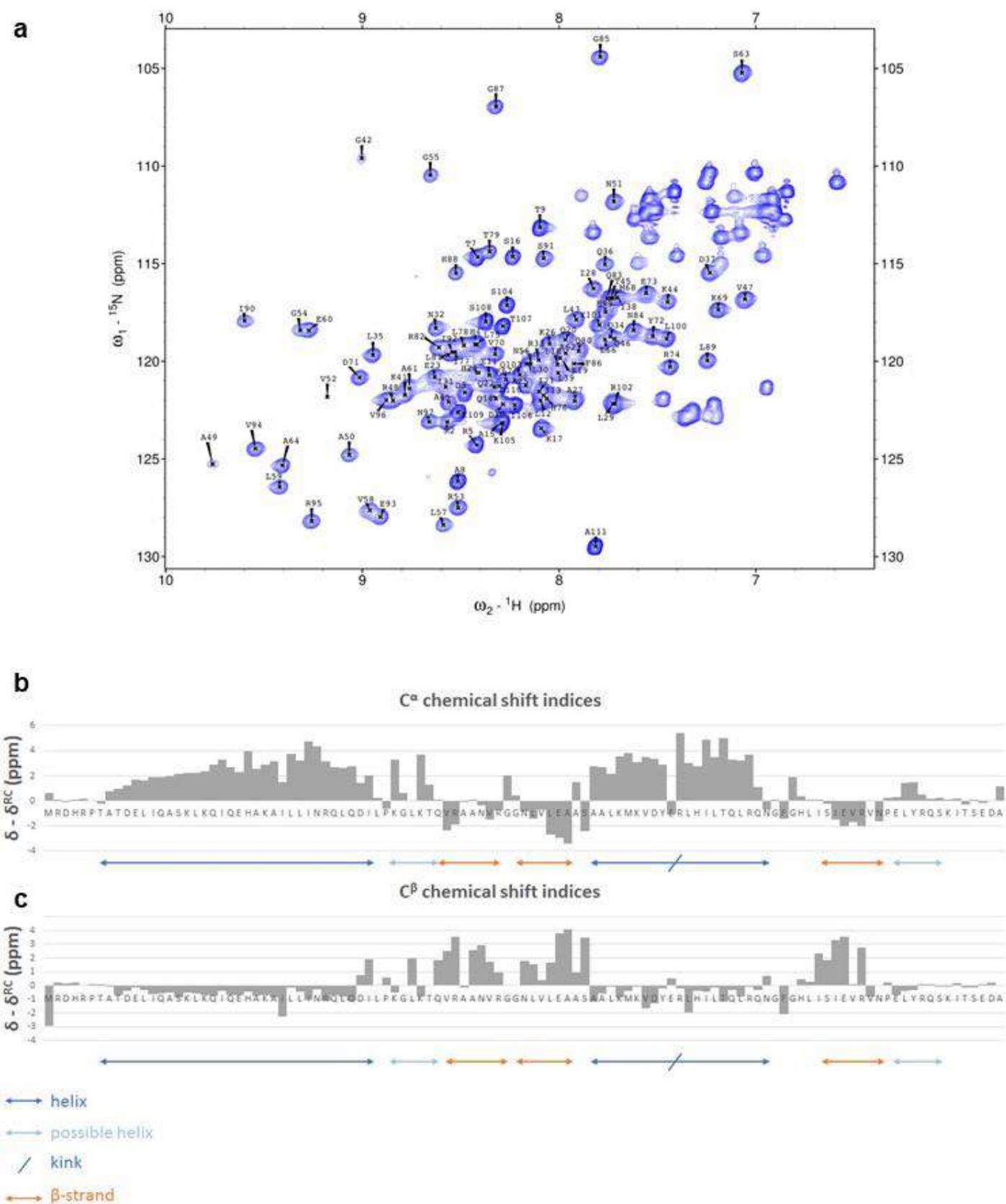


Supplementary Fig. 2. Quantification of VcDnaB hexamers by negative staining electron microscopy. The number of hexameric particles per surface unit of VcDnaB alone, in presence of VcDciA with or without ATP, or in presence of ATP, AMP-PNP or ADP is plotted.

Figure S3

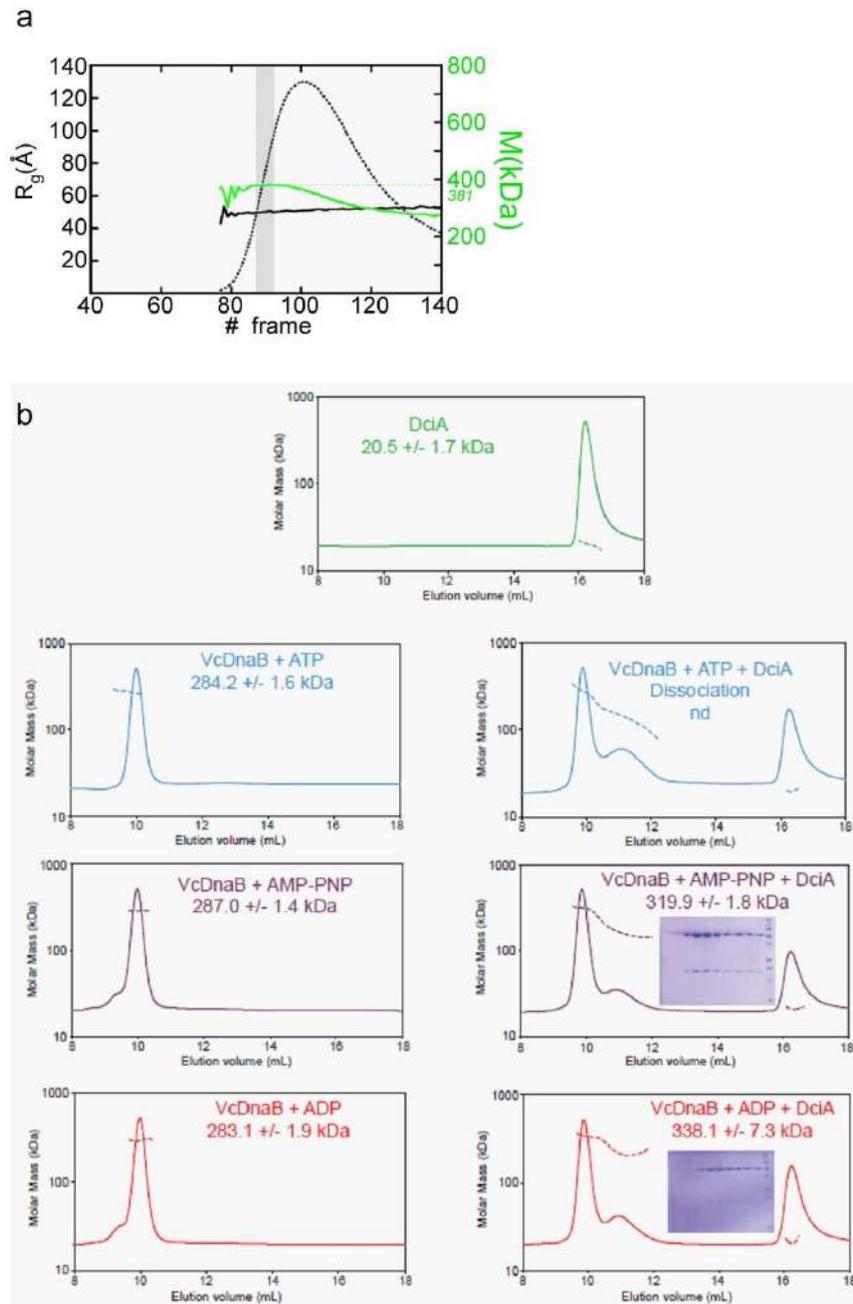


Supplementary Fig. 3. The interaction of VcDciA with ssDNA is negligible according to the SPR conditions used for DnaB. As indicated on each sensorgram, the SPR analysis was carried out in presence of ATP and MgCl₂ (A and B) or just in presence of ATP (C and D). VcDciA concentrations injected corresponded to the concentrations used in binding stimulation (see Figure 3A), 625 nM, 417 nM, 312 nM, 208 nM and 104 nM respectively from black to light grey.



Supplementary Fig. 4. NMR. a, ^{15}N - ^1H HSQC spectrum of VcDciA^[1-111] with peak assignments derived from 3D experiments giving chemical shifts of backbone atoms. Unassigned peaks correspond to the side chains of Asn and Gln residues (top right region) and Arg residues (bottom right region). **b,c**, Chemical shift indices for VcDciA^[1-111] calculated on the basis of C^α (**a**) and C^β (**b**) chemical shifts compared to a random coil reference. Corresponding secondary structure elements are displayed in blue for α -helices (dark blue for confidently assigned helices and light blue for possible helices) and orange for β -strands. A kink in the second confident helix is indicated by an oblique line.

Figure S5



Supplementary Fig. 5. Stoichiometry calculation of the VcDnaB•VcDciA complex by SEC-SAXS and SEC-MALS. a, Evolution of the gyration radius R_g (black line) during SEC-SAXS elution, together with the molar mass (green line) and the forward scattered intensity $I(0)$ (dashed black line), obtained using the US-SOMO HPLC module, for VcDnaB•ATP•VcDciA. VcDnaB•ATP•VcDciA complexes compatible with 6/3 stoichiometry ($M \approx 380$ kDa) were first eluted but dissociated rapidly as indicated by the decrease of M . **b,** SEC-MALS analysis of VcDciA and VcDnaB, and determination of the stoichiometry of the VcDciA•VcDnaB complexes in presence of various nucleotides. At the top and on the left: The SEC-MALS elution profiles of VcDciA and VcDnaB in presence of ATP, AMP-PNP or ADP (1 mM final) and $MgCl_2$ (0.5 mM final) on a Superdex 200 10/300 GL increase column, loaded at 2 mg/mL, are shown as green, blue, purple and red full lines, respectively. On the right: The elution profiles of their mixtures (VcDciA is then in 2-fold mole-to-mole excess for VcDnaB) are shown in the same color-code according to the type of nucleotide added. The column buffer is composed by 20 mM Tris-HCl (pH 8.8) + 100 mM NaCl + 1 mM ATP. Dotted lines indicate the molar masses. The elution fractions of the VcDnaB•VcDciA complexes in presence of AMP-PNP and ADP were collected and loaded onto SDS-PAGE gels and colored with Coomassie blue.

Figure S6

a

WA : Walker A
 WB : Walker B
 CE : Catalytic Glutamate

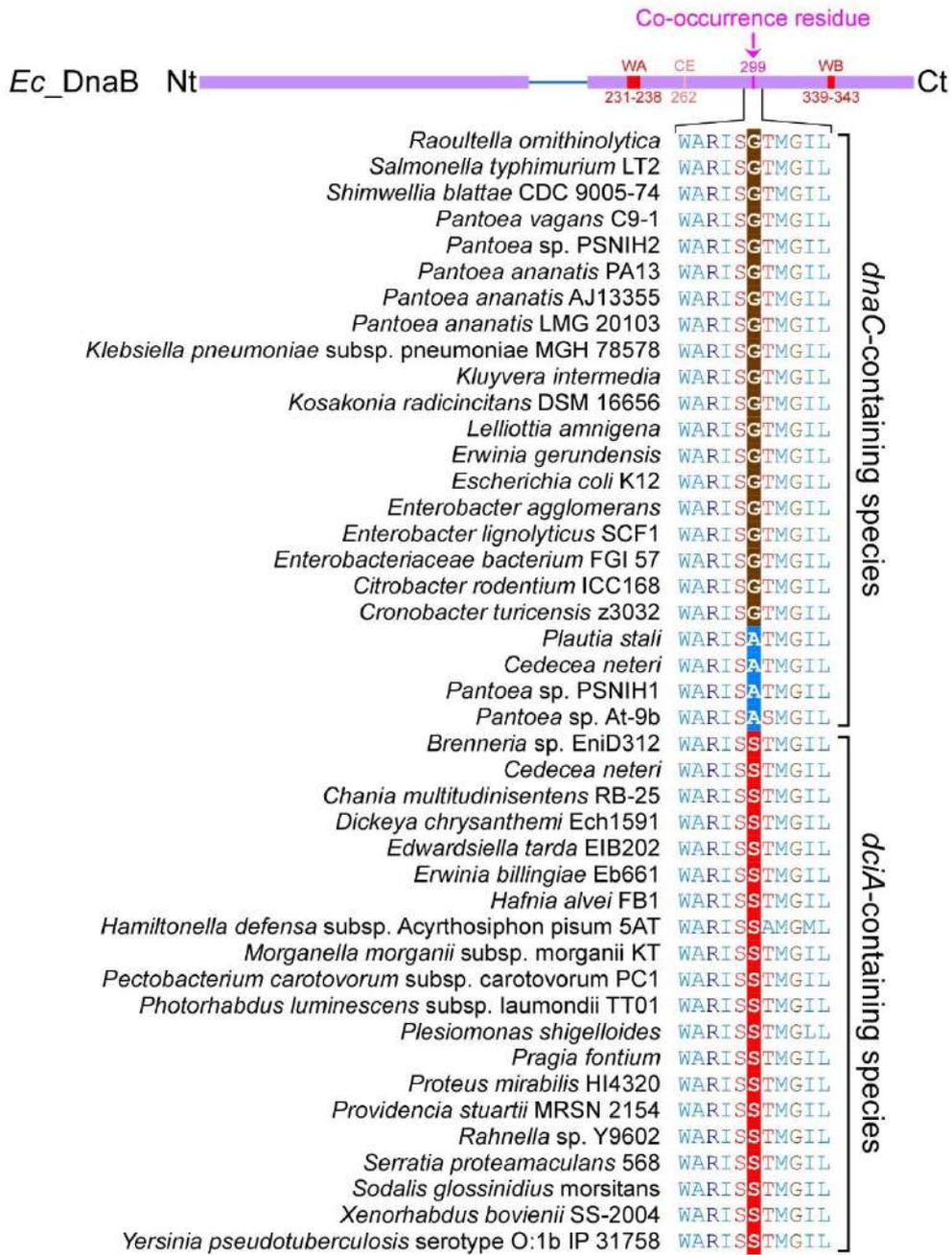
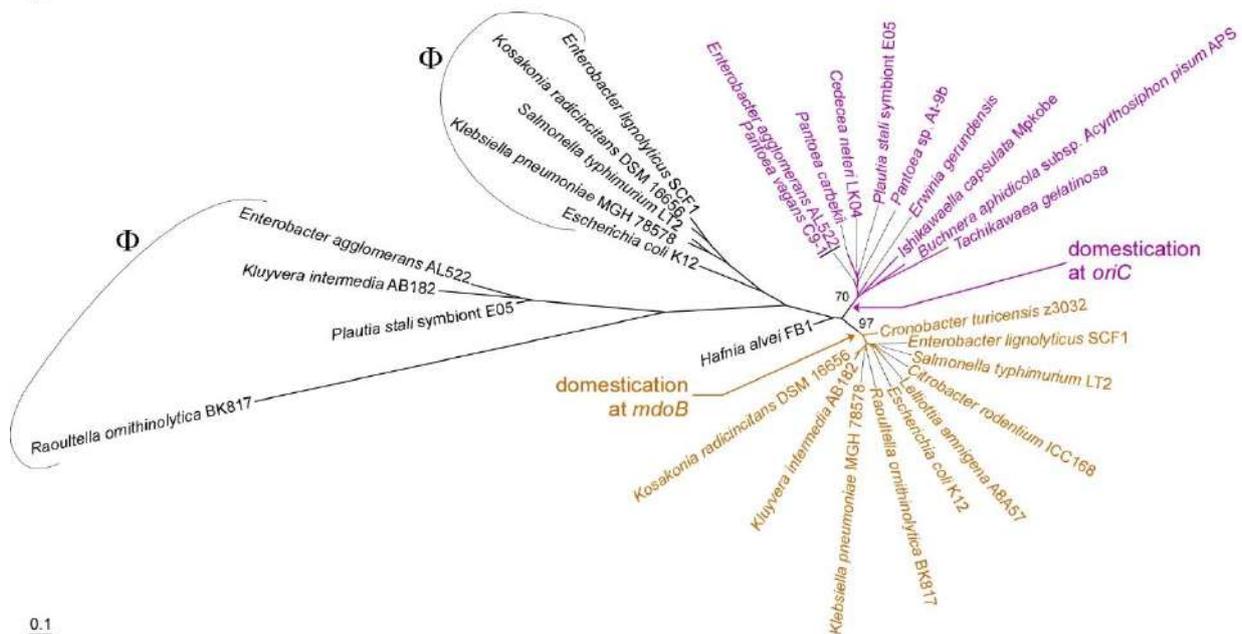


Figure S6

b



0.1

c

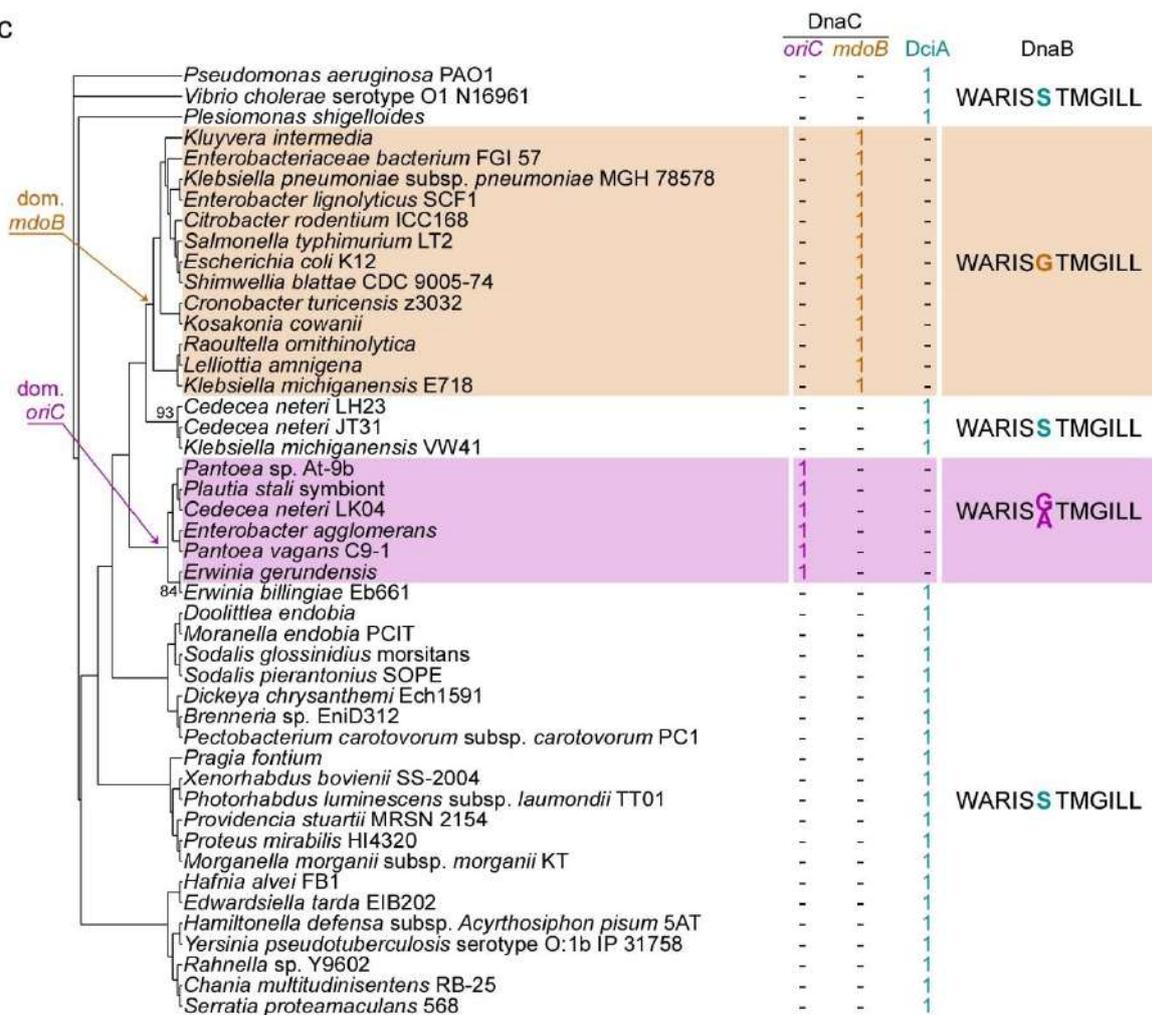
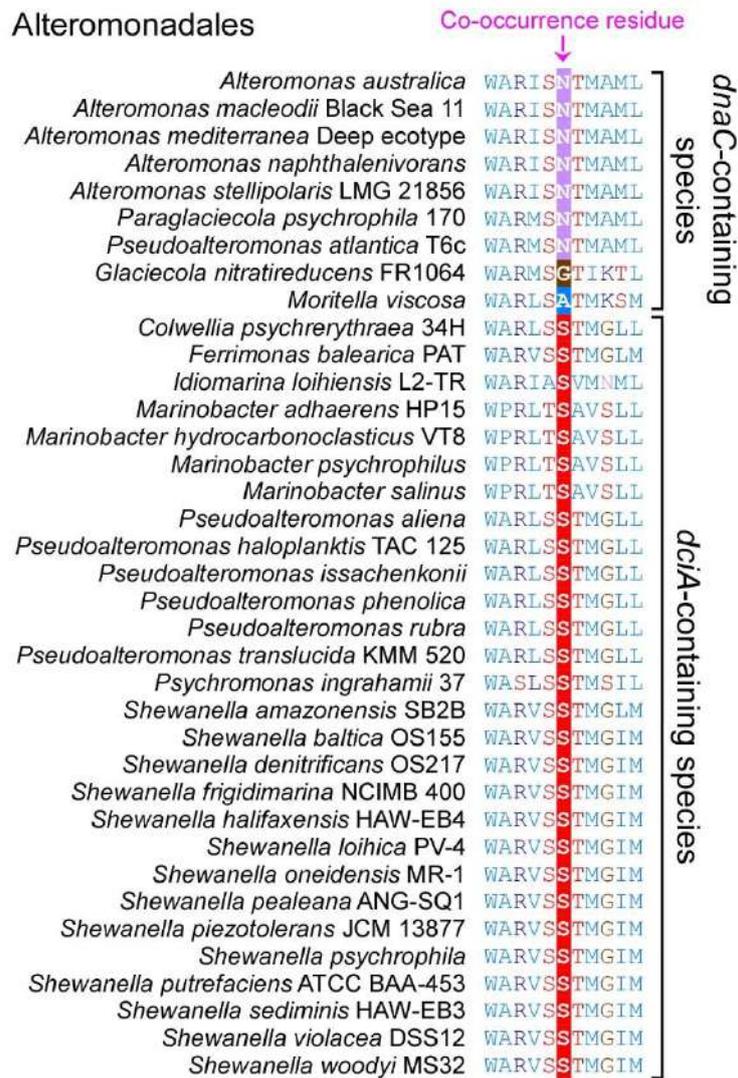


Figure S6

d



Supplementary Fig. 6. The co-occurrence residue discriminates the replicative helicase. **a**, Alignment of replicative helicase protein sequences around the co-occurrence residue in Enterobacteriales. **b**, Alignment of replicative helicase protein sequences around the co-occurrence residue in Alteromonadales. **c**, Top: Phylogenetic tree of Enterobacteriales based on DnaC sequences of each species analyzed (see Methods). Protein sequences containing the Pfam domain PF01695 were collected (duplicate genes were eliminated). Two distinct clades emerged from the phylogenetic tree, regrouping *dnaC* genes with distinct genomic contexts. Organisms in which *dnaC* is next to *oriC* are in purple while those in which *dnaC* is next to *mdoB* are in light brown. *dnaC* genes located in phage genomes (ϕ) are in black. Scale bar represents 0.1 substitution per site. Bottom: Cladogram based on DnaA-DnaB-DnaX-DnaE-concatenated protein sequences of the Enterobacteriales (Methods). Species containing a *dnaC* next to *oriC* (purple), next to *mdoB* (light brown) or *dciA* (blue) are identified with a '1'. The co-occurrence helices (CH), containing the co-occurrence residue (positions 294 to 305 in *E. coli*) are indicated. The co-occurrence residues are represented either in blue (*dciA*-species) or in purple or light brown (*dnaC*-species). The two probable origins of *dnaC* in Enterobacteriales are pointed at with a purple and a light-brown arrow. Significant bootstrap scores of interest (> 70%) are indicated.

Supplementary Tables

Supplementary Table 1. Sequences of the oligonucleotides used in helicase tests and SPR analysis

<i>Name</i>	<i>Size (nt)</i>	<i>Sequence (5' → 3')</i>
oso3	50	CY5- GCAGGCTCGTTACGTAGCTGTACCG-dT(25)
oso7	25	GCAGGCTCGTTACGTAGCTGTACCG
oso13	50	Biotin- GCAGGCTCGTTACGTAGCTGTACCG(dT)25
oso16	75	Biotin- dT(50)-CGGTACAGCTACGTAACGAGCCTGC
oso15	50	GCAGGCTCGTTACGTAGCTGTACCG(dT)25-Biotin

Oligonucleotides are used as indicated in Material and Methods.

Supplementary Table 2. X-ray statistics

	VcDnaB † GDP:AlF ₄ + Mg	VcDnaB.DciA § GDP:AlF ₄ + Mg
Data collection*		
Space group	<i>P2₁2₁2₁</i>	<i>H32</i>
Cell dimensions		
<i>a, b, c</i> (Å)	118.9, 123.2, 263.4	186.5, 186.5, 256.7
α, β, γ (°)	90.0, 90.0, 90.0	90.0, 90.0, 120.0
Resolution range (Å)	50 – 3.9 (4.16 – 3.9)	50 – 3.3 (3.47 – 3.3)
I/ σ (I)	6.7 (1.2)	7.0 (1.6)
R _{merge} (%)	46.2 (777.2)	32.1 (235.7)
R _{pim} (%)	10.9 (193.5)	10.1 (75.1)
Completeness (spherical, %)	80.2 (23.1)	51.2 (18.9)
Completeness (ellipsoidal, %)	94.3 (73.8)	93.4 (83.0)
Redundancy	18.4 (16.6)	11.2 (10.8)
CC(1/2)	0.994 (0.378)	0.995 (0.472)
Refinement		
Resolution range (Å)	50.0 – 3.9	46.6 – 3.3
No. reflection work set/test set	27099/1373	12931/734
R/R _{free} (Buster, %)	25.2/26.8	30.9/32.3
No. atoms		
Protein	20594	7905
Ligand/ion	204	34
water	0	0
R.m.s. deviation bonds (Å)	0.008	0.008
R.m.s. deviation angles (°)	0.94	0.87
Average B-factor (Å ²)		
From atoms	147.2	155.1
From Wilson plot	199.1	97.8
Ramachandran plot		
Most favored (%)	93.9	94.5
outliers (%)	0.3	0.6
Molprobit score	2.3	2.09

* Values in parentheses refer to the highest resolution shell.

† Diffraction data collected from one crystal, which diffracted anisotropically to 3.75 Å along *a*^{*}, 4.4 Å along *b*^{*} and 4.22 along *c*^{*}.

§ Diffraction data collected from one crystal, which diffracted anisotropically to 3.18 Å along 0.894 *a*^{*} - 0.447 *b*^{*}, 3.18 Å along *b*^{*} and 6.4 Å along *c*^{*}.

Supplementary Table 3. SAXS values

	VcDnaB	VcDnaB•ATP	VcDnaB•ATP•VcDciA	VcDciA
--	--------	------------	-------------------	--------

Data collection parameters				
Instrument	SWING (SOLEIL)			
Detector	EIGER 4M (Dextris)			AVIEX CCD
Wavelength [Å]	1.0			
q-range [Å ⁻¹]	0.005 - 0.6			
Absolute scaling	Comparison with scattering from pure H ₂ O			
Exposure time [s]	2.99			2
SEC-SAXS column	Superose 6 (GE) Increase 10x300	Superdex 200 Increase 10x300 (GE)		Superose 6 (GE) Increase 10x300
Loading concentration [mM]	0.23	0.53	0.31 (VcDnaB) 0.62 (VcDciA)	0.31
Injection volume [μL]	95	48	84	95
Flow rate [mL.min ⁻¹]	0.5			
Temperature [°C]	15			
Used frames		100-109	87-92	102-127
Guinier analysis				
R _g Guinier [Å]	<i>See Fig. 2A (top)</i>	46.4±0.5	49.9±0.5	27.0±0.2
qR _g -range		0.28-1.0	0.38-1.0	0.32-1.20
P(r) analysis				
R _g [Å]		46.8±0.2	49.7±0.2	28.0±0.1
D _{Max} [Å]		130	155	101
q-range [Å ⁻¹]		0.0061-0.172	0.0076-0.160	0.0118-0.4
Molecular mass determination				
MM _{sequence} [kDa] ^a		52.782	52.782-18.365	18.365
MM _{correlation volume} [kDa] ^b	<i>See Fig. 2A (top)</i>	328 ± 20	381 ± 20	18.4
DADIMODO analysis				
q-range		0.0066 - 0.4	0.0051 - 0.3	0.0124 - 0.4
Model number		10	10	10
χ ²		3.83 - 4.11	1.77 - 1.97	0.57 - 0.58

^a The calculated masses were derived from the sequences.

^b The protein concentration *c* of the sample during the elution cannot be properly determined due to the presence of ATP. The mass determination using the correlation volume method (Rambo and Tainer approach) does not depend on the value of *c* and provides a useful alternative to the usual derivation of *M* from the *I*(0)/*c* value.

Supplementary References

1. Proenca, D. et al. A two-component, multimeric endolysin encoded by a single gene. *Mol Microbiol* **95**, 739-53 (2015).
2. Loiseau, L. et al. The UbiK protein is an accessory factor necessary for bacterial ubiquinone (UQ) biosynthesis and forms a complex with the UQ biogenesis factor UbiJ. *J Biol Chem* **292**, 11937-11950 (2017).

1. Exploration de l'implication de la sérine 296 (S296) de DnaB dans l'interaction entre DnaB et DciA

Une analyse phylogénétique des séquences des hélicases répliquatives a révélé l'existence d'une position particulière (Marsin *et al.* soumis). Cette position est occupée par un résidu, spécifique des organismes à DciA ou à DnaC. En position 296, l'hélicase de *V. cholerae* (VcDnaB) spécifie une sérine tandis qu'une glycine est présente à cette même position (299 dans EcDnaB) dans les hélicases à DnaC comme celle d'*E. coli* (Marsin *et al.* soumis). Nous savons que la Glycine en position 299 dans EcDnaB est critique pour l'initiation de la réplication ; à température thermosensible, le mutant *dnaB^{G299D}* (*E. coli*) est bloqué à l'initiation de la réplication (Saluja et Godson 1995) et nous avons montré que la présence de la sérine en position 296 dans VcDnaB est essentielle in-vivo, alors qu'in vitro, les activités de charge et de translocation de la protéine sauvage et mutante (VcDnaBS296G) sont identiques (Marsin *et al.* soumis). Nous en avons déduit que l'essentialité du résidu sérine en position 296 observé chez *V. cholerae* n'était pas associée à l'activité de l'hélicase répliquative, mais plutôt à l'implication de l'hélicase au cours de l'initiation de la réplication.

Nous nous sommes aidés de la structure cristallographique du complexe VcDnaB:VcDciA (Marsin *et al.* soumis) pour observer le positionnement de ce résidu dans la protéine. La sérine 296 est située à distance de contact d'un coude formé à l'intérieur d'une hélice alpha appartenant au domaine N-ter de DciA. L'analyse de la densité électronique de cette région de DciA dans le cristal du complexe VcDnaB:VcDciA suggère que toutes les chaînes latérales des résidus situés autour de l'arginine R74 (R74), et hormis R74, sont disposées de telle façon qu'elles ne peuvent interagir avec la sérine S296, ce qui place R74 comme bon candidat pour une interaction avec S296 (Figure R1). Quoique l'interaction entre S296 et R74 par l'intermédiaire d'une liaison hydrogène soit probable, la forte anisotropie de notre cristal ne nous permet pas de la confirmer avec certitude. Il est cependant très improbable qu'une liaison faible de type hydrogène, si elle existe, définisse la stabilité du complexe. Cependant, elle pourrait être importante pour la fonction de l'hélicase ou du complexe VcDnaB:VcDciA.

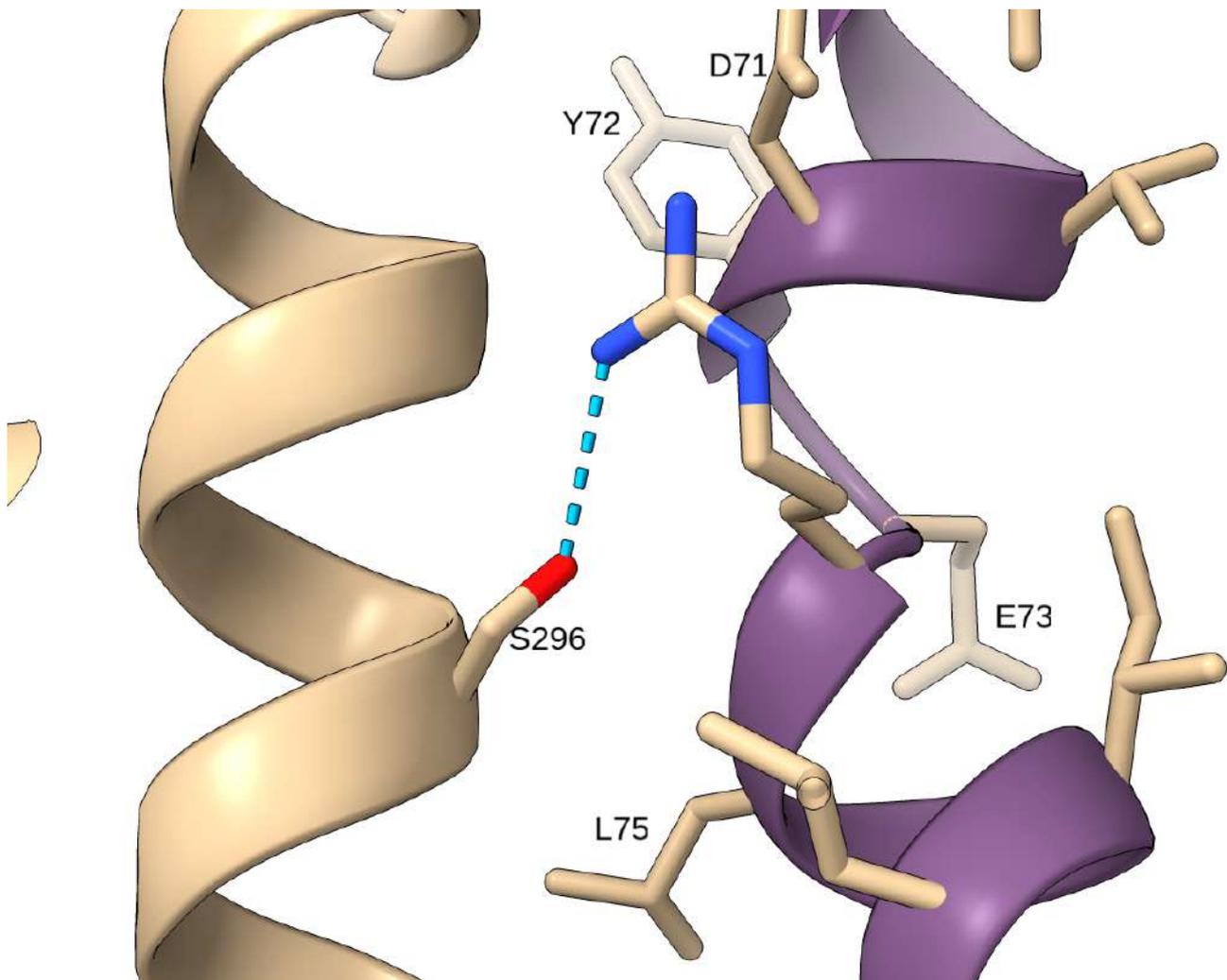


Figure R1. La chaîne latérale de l'arginine 74 (R74) est la plus apte à interagir avec la sérine S296. Détail de l'espace à proximité du résidu S296 (co-occurrence residue, voir Marsin et al.). Les résidus de l'hélice $\alpha 2$ de DciA (contenant le résidu E73 en coude) sont indiqués. La chaîne latérale du résidu R74 est la seule dans cet espace à pouvoir adopter une conformation apte à interagir avec la sérine 296 de VcDnaB.

Nous avons voulu savoir dans un premier temps si le phénotype de létalité dû à la substitution S296G observé *in vivo* chez *V. cholerae*, résultait de la rupture de cette liaison hydrogène potentielle. Nous avons adressé cette question de deux façons : en testant par double hybride l'influence de cette liaison potentielle sur l'interaction entre DnaB et DciA et en testant la viabilité de cellules exprimant une protéine DciA mutée dans la position supposée partenaire de la serine 296, c'est-à-dire la position 74 de DciA.

2. Interaction entre DciA et DnaB - Analyse de la liaison hydrogène par approche double hybride

Nous avons utilisé la méthode développée par Ladant (Karimova *et al.* 1998) de la restauration de l'activité adénylate cyclase pour analyser l'interaction entre DciA et DnaB selon que le résidu S296 de DnaB soit sauvage ou muté. Pour chaque couple de protéines (DciA/DnaB et DciA/DnaBS296G) dont l'interaction est analysée, les séquences codantes des protéines sont fusionnées en phase pour l'une à un fragment d'ADN qui code le domaine catalytique de l'adénylate cyclase *Bordetella Pertussis* (Cat_domaine) et pour l'autre un fragment d'ADN qui code le domaine de liaison à la calmoduline de la même enzyme (Cal_domaine). Les gènes de fusion ainsi créés sont clonés sur plasmide et introduits par transformation naturelle dans des cellules d'*E. coli* dépourvues du gène endogène de l'adénylate cyclase (*E. coli* cya-) (annexes). Les souches transformées par ces plasmides sont cultivées en milieu minimum maltose à 30°C supplémenté avec du X-Gal et l'expression des protéines de fusion est induite à l'IPTG. Lors d'une interaction entre les deux protéines testées, l'activité adénylate cyclase est reconstituée du fait de la réassociation des Cat_domaine et Cal_domaine, conduisant à la synthèse de beta-galactosidase révélée par crible blanc/bleu (Karimova *et al.* 1998). Nos résultats montrent que l'interaction de VcDnaB et VcDciA n'est pas impactée par la substitution S296G qui devrait abolir toute possibilité de liaison hydrogène (Figure R2) Ainsi, si une liaison hydrogène existe entre S296 de DnaB et R94 de DciA, sa rupture n'affecte pas la stabilité

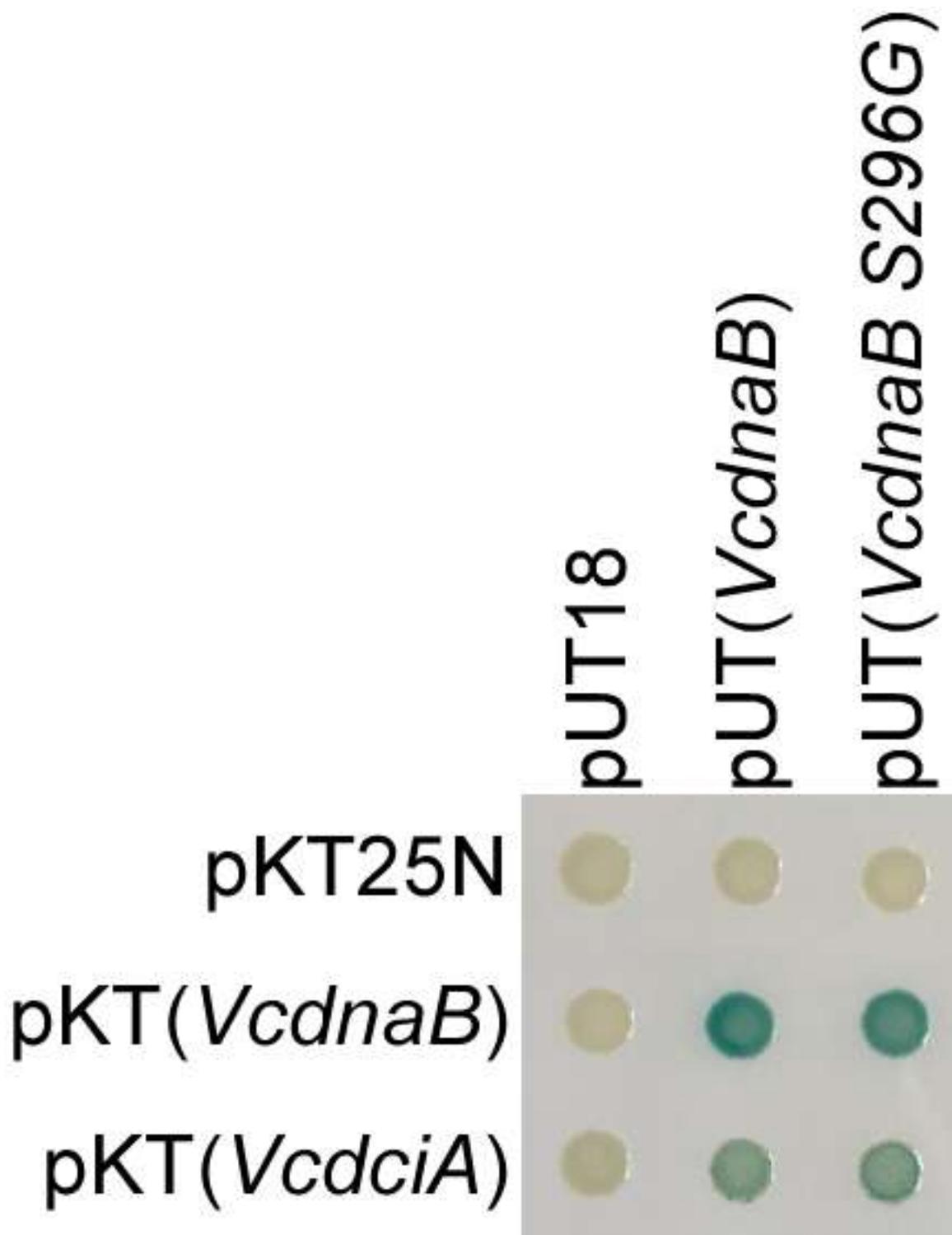


Figure R2. La substitution S296G n'affecte pas l'interaction entre VcDnaB et VcDciA. L'interaction entre VcDnaB et VcDciA est suivie par test double hybride à partir de la reconstitution de l'activité adénylate cyclase (Karimova *et al.* 1998). Les sections codantes des protéines VcDnaB, VcDnaBS296G et VcDciA ont été clonées dans les plasmides pUT18 et pKT25N. 0,01 OD de chacun des doubles transformants à ensuite été déposé sur milieu minimum sélectif (Karimova *et al.* 1998). La couleur bleue est révélatrice de la production de β -galactosidase et donc de la reconstitution de l'activité adénylate cyclase et donc de l'interaction entre les 2 protéines testées.

du complexe VcDnaB:VcDciA. Nous concluons que l'altération de la stabilité du complexe VcDnaB:VcDciA ne peut être la cause de la létalité associée au mutant DnaBS296G mis en évidence plus haut (Marsin *et al.* soumis).

3. Interaction entre DciA et DnaB - Analyse *in vivo* par mutagenèse ciblée

Dans un second temps, nous avons testé la fonctionnalité d'une potentielle interaction entre S296 et R94. Puisque le résidu S296 est essentiel (Marsin *et al.* soumis), nous avons testé la viabilité de différents mutants de *dciA* modifiés au niveau du résidu 74, en considérant que si la létalité du mutant DnaBS296G était associée à la rupture d'une liaison hydrogène avec l'arginine 74 de DciA, un mutant de *dciA* qui empêcherait toute liaison avec DnaB devrait lui-même être létal. Nous avons substitué l'arginine en position 74 par les 19 autres acides aminés et évalué la viabilité des 19 allèles de *dciA* ainsi créés. Chaque allèle de *dciA* a été cloné sur un plasmide et l'expression du gène a été placée sous le contrôle d'un promoteur inductible à l'arabinose. Ce plasmide a été introduit dans la souche YAV20 dans laquelle la version sauvage du gène *dciA* est délétable (Figure R3A). Dans ces transformants, l'arabinose induit d'une part, l'expression de la copie mutante plasmidique de *dciA* dans la cellule en même temps qu'elle induit, d'autre part, la délétion du gène *dciA* sauvage. Pratiquement, l'expérience a été réalisée de telle sorte que la délétion de la copie sauvage de *dciA* soit induite pendant l'introduction par conjugaison naturelle dans la souche YAV20 des plasmides contenant les copies mutantes de *dciA* (Figure R3A).

Les conjugaisons ont été réalisées en arabinose (0,02% final) ou sans arabinose pendant trois à quatre heures d'incubation à 30°C puis les cellules sont étalées à 30°C et 42°C, sur boîte Luria-Bertani avec kanamycine contenant ou non avec de l'arabinose. Nous pouvions ainsi déterminer la fraction de cellules viables après délétion de la copie sauvage de *dciA* (cellules viables en arabinose/cellules viables sans arabinose : CFU +ara/CFU -ara) et expression de la copie plasmidique à 30°C ou 42°C (figure R3B). Typiquement, les colonies qui apparaissent après 24 heures de croissance

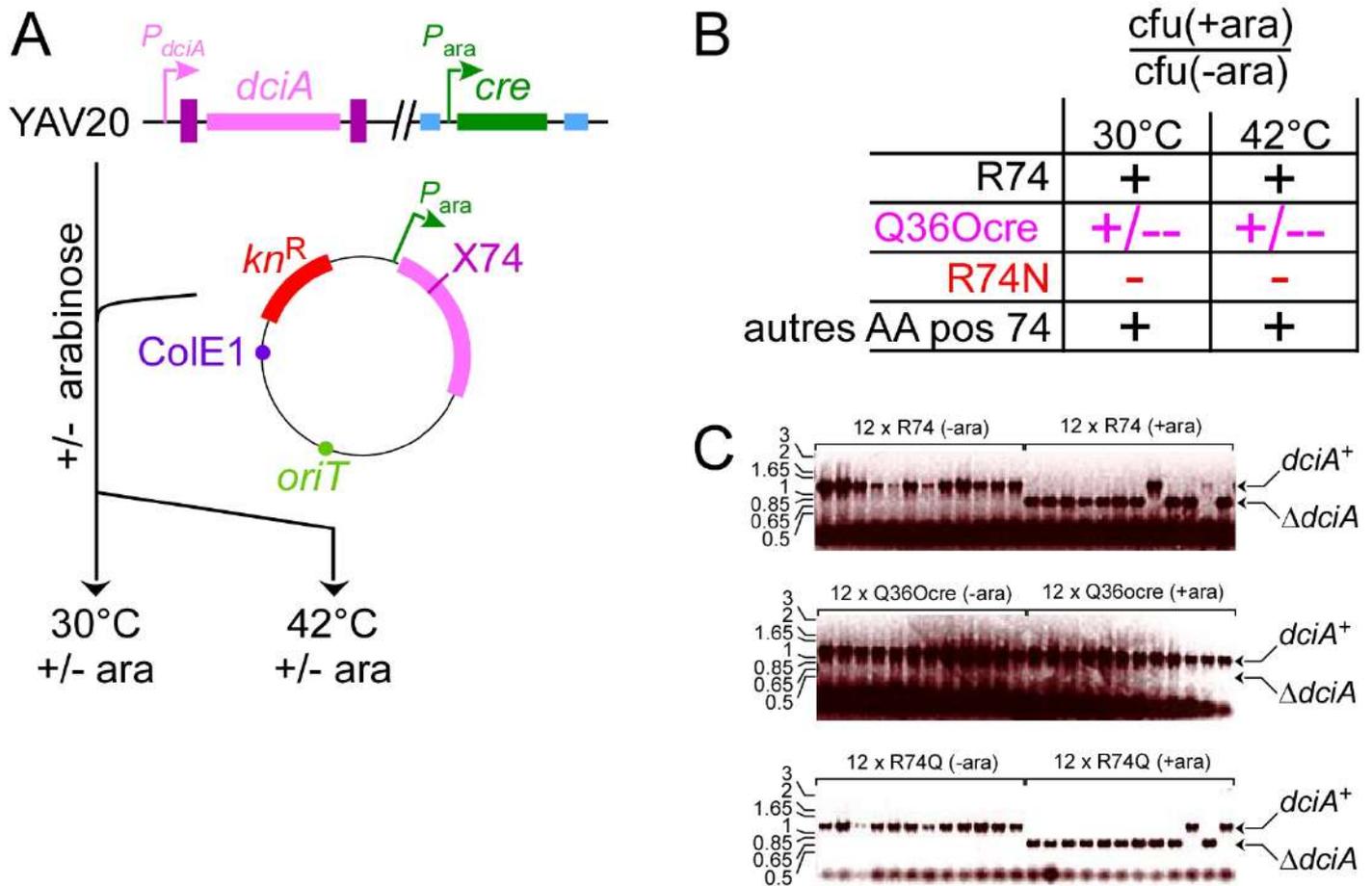


Figure R3. Mutagenèse de la position 74 de DciA et impact sur la viabilité de *V. cholerae*. **A.** Remplacement allélique de *dciA*. Les 19 allèles mutants de *dciA* (R74 → X74) ont été clonés et placés sous le contrôle d'un promoteur inducible à l'arabinose dans le plasmide ColE1. Le plasmide est ensuite introduit par conjugaison à l'aide de son origine de transfert (*oriT*) dans la souche YAV20. La conjugaison a été réalisée en présence d'arabinose pour déclencher simultanément la délétion du gène endogène *dciA* et l'expression de la copie plasmidique testée dans YAV20. Une expérience contrôle a été réalisée sans arabinose. Les conjugants sont ensuite sélectionnés par leur résistance à la kanamycine (Kn^R), toujours en présence ou en absence d'arabinose. L'expérience a été réalisée à deux températures différentes, 30°C et 42°C. **B.** Le nombre de conjugants a été compté et le rapport [cfu (+ara)/cfu (-ara)] a été déterminé : allèles testés viables (+), non viables (+/--) et toxiques (-). **C.** La délétion de *dciA* au locus endogène a été investiguée par PCR. 12 conjugants obtenus en présence (+ara) ou en absence d'arabinose (-ara) ont été analysés. Sont présentés des conjugants analysés pour la fonctionnalité de l'allèle sauvage plasmidique R74 où des allèles mutants Q36Ocre et R74Q.

sur arabinose peuvent avoir conservé la copie endogène du gène *dciA* ou l'avoir perdue. Par contre, les colonies qui apparaissent après 24 heures sur milieu non complété en arabinose possèdent encore toutes, la copie sauvage de *dciA*. Nous avons vérifié la complémentation fonctionnelle en testant l'allèle sauvage R74.

La non-complémentation fonctionnelle a été testée sur un mutant nul *dciA* dans lequel un codon « Stop » a été introduit au début de la phase codante de *dciA* (Q36Ocre) (Figure R3B); seules quelques colonies ont poussé en présence d'arabinose (~ 10 % du nombre observe lorsque les cellules ont été étalées sur milieu non complété en arabinose). 12 colonies ont été analysées par PCR pour vérifier l'état du gène *dciA* au site endogène. Nos résultats indiquent que toutes ces colonies proviennent de cellules n'ayant pas perdu le gène *dciA* (Figure R3C).

Le même type d'analyse réalisée sur des colonies issues de la transformation de l'allèle sauvage (R74) ou des allèles mutants révèle qu'une très grande majorité de clones ont perdu la copie endogène de *dciA*, et que tous les mutants de *dciA*, sauf un, sont viables (Figure R3A).

En particulier plusieurs mutants exprimant une protéine DciA dans laquelle l'arginine 74 a été remplacée par un résidu apolaire ont pu être obtenus. Etant donné que ces protéines mutantes sont incapables d'établir une liaison hydrogène avec la sérine 296 de l'hélicase, nous concluons que la létalité du mutant DnaBS296G n'est pas associée à la rupture de cette liaison hydrogène potentielle.

Un mutant se comporte de façon atypique. Le phénotype du mutant *dciA* R94N est plus sévère que celui du mutant *dciA*Q36ocre; non seulement la protéine mutante DciAR94N est incapable de compléter la perte de *dciA*, mais cet allèle se révèle toxique puisque nous n'avons pas pu isoler de clone contenant le gène *dciA* endogène. Quoique nous n'ayons pu établir l'existence d'une liaison hydrogène entre l'arginine 74 de DciA et la sérine 296 de DnaB nous montrons néanmoins que la position 74 de DciA est importante puisque la substitution R74N est non viable et toxique.

Partie II. DciA n'est pas indispensable à la charge de l'hélicase répliquative *in vivo*

1. DciA est essentiel

Les bactéries appartenant à l'ordre des Vibrionales, parmi lesquelles se trouve *V. cholerae*, la bactérie modèle dans laquelle nous étudierons DciA, possèdent deux chromosomes possédant chacun une origine de réplication distincte. Cette différence d'organisation du génome pouvant occasionner des modifications dans le programme de réplication et donc dans la gestion des hélicases répliquatives, nous avons vérifié si, comme dans *P. aeruginosa*, le gène *dciA* était essentiel dans *V. cholerae* (Brézellec *et al.* 2016). En particulier, il serait possible que de par son origine plasmidique, le chromosome II puisse posséder son propre système de gestion des hélicases et que celui-ci puisse être utilisé pour la réplication des 2 chromosomes de cette bactérie.

Afin de déterminer l'essentialité de *dciA*, nous avons construit une souche dans laquelle nous pouvions induire sous contrôle la délétion du gène *dciA*. Nous avons introduit deux sites *LoxP* aux deux bornes de la séquence codante du gène *dciA* : l'une de ces séquences a été introduite entre les séquences promotrice et codante du gène *dciA*, et l'autre a été placée immédiatement en 3' de la séquence codante (YAV18, Figure R4), de telle sorte qu'un événement de recombinaison entre les deux séquences *LoxP* conduise à une délétion propre de la phase codante de *dciA* et une circularisation de cette phase sans séquence promotrice (Figure R5A). Les séquences *LoxP* sont reconnues spécifiquement par la recombinase Cre qui provoque un événement de recombinaison entre ces deux séquences. Nous avons donc introduit le gène *cre* dans le génome de *V. cholerae*, et placé son expression sous le contrôle du promoteur pBAD qui est inductible à l'arabinose. Le gène *cre* a été introduit au site *lacZ* sur le chromosome (YAV20, Figure R4). Dans ces conditions, la délétion de *dciA*, est donc conditionnée à l'expression de Cre et donc à l'addition d'arabinose dans le milieu de culture (Figure R5A).

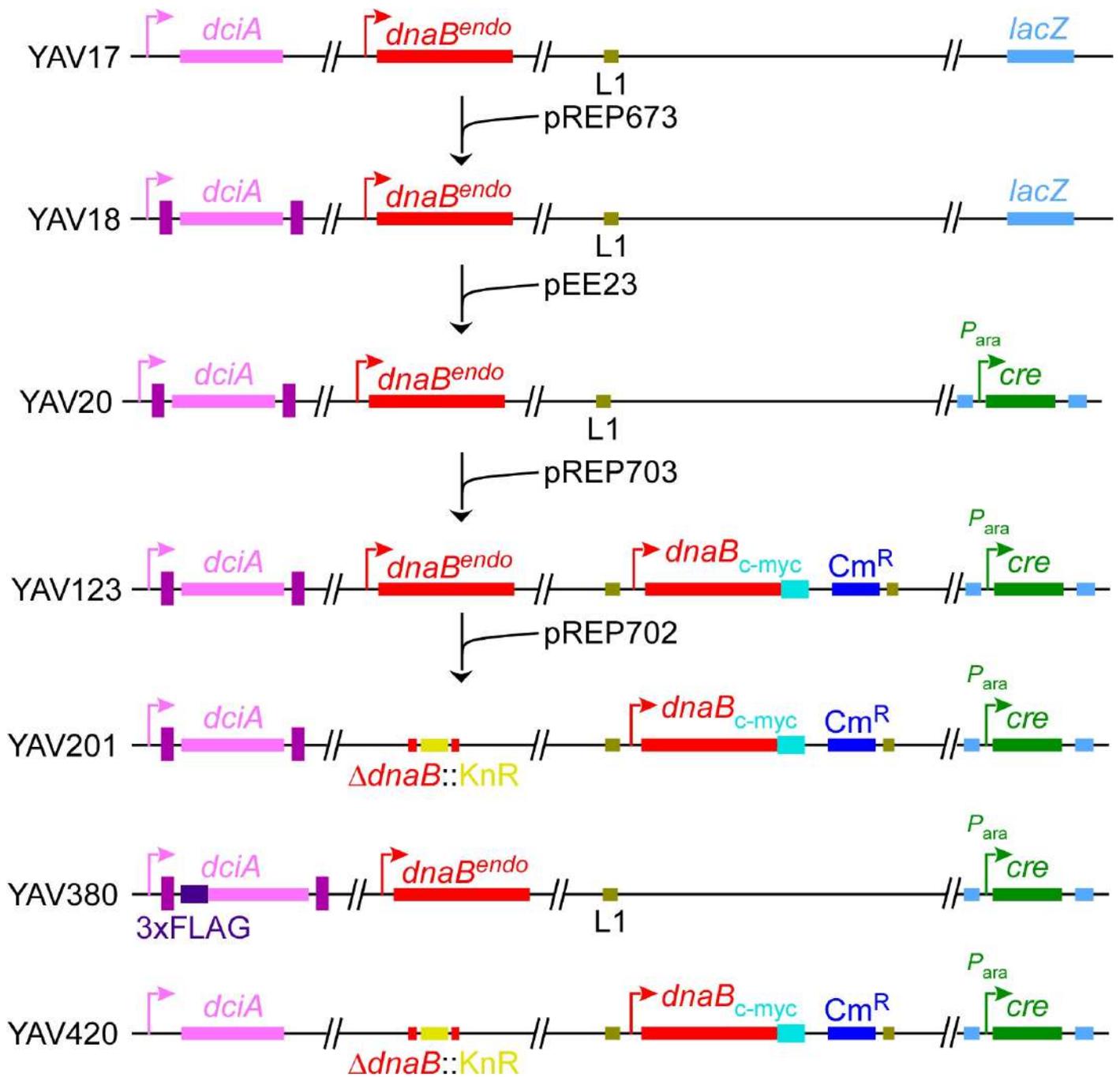


Figure R4. Description et construction des souches analysées. La phase codante de *dciA* est encadrée par 2 sites *loxP* afin de tester l'essentialité du gène *dciA* et d'étudier l'évolution d'une souche après délétion de *dciA* (YAV17 à YAV20). Les étapes conduisant à l'introduction d'une extension c-Myc en Cter du gène *dnaB* au site L1 du chromosome I de *V. cholerae* sont également présentées (YAV129 et YAV201). Dans La souche YAV380 dérivée de la souche YAV20, une extension codant pour l'épitope 3xFlag a été fusionnée à l'extrémité 5' du gène *dciA*.

Temps (min)	0	30	45	60	75	90	105	120
- ara	280	502	1205	1601	2144	>2300	nd	nd
+ ara		827	1023	488	151	37	36	29

Tableau R1. DciA est essentiel dans *V. cholerae*. Une culture de la souche YAV20 en phase exponentielle de croissance (temps 0) a été répartie en deux fractions. De l'arabinose est ajouté dans l'une (+ara) et l'autre est laissée telle quelle (-ara). Les deux fractions sont remises en culture et des aliquotes sont prélevées à différents temps et étalées sur boîte. L'évolution des CFU (CFU : Colony Forming Unit) est présentée dans le tableau en fonction du temps, après addition d'arabinose et selon chaque condition analysée (-ara ou +ara). Une aliquote a été également étalée avant le fractionnement (temps 0). Les cultures ont été réalisées à 37°C en milieu LB.

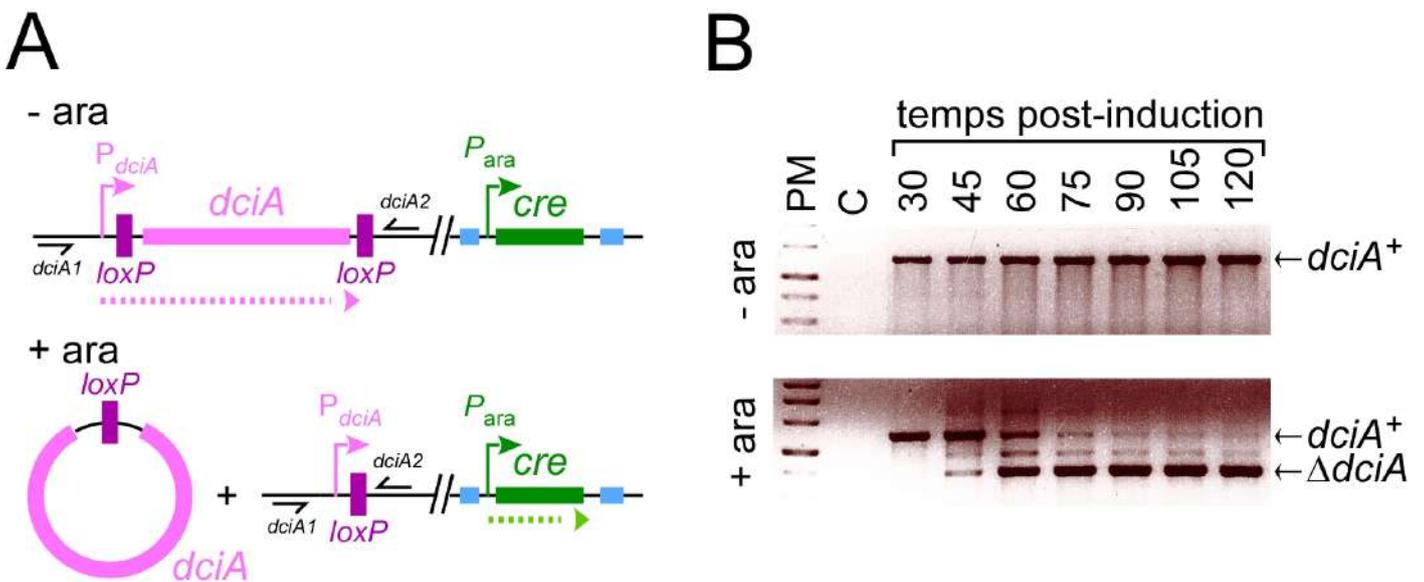


Figure R5. Le gène *dciA* est essentiel dans *V. cholerae*. **A** – Le gène *dciA* est encadré par deux sites *LoxP* et sa délétion est induite par la recombinase *Cre* dont l'expression est sous le contrôle du promoteur P_{ara} . L'induction de la *Cre* recombinase (+ ara) induit la circularisation de la phase codante de *dciA* sans la séquence promotrice P_{dciA} . En absence d'arabinose (- ara), les cellules sont phénotypiquement *dciA*⁺. **B** – Les échantillons de cellules prélevés à intervalles de temps (30 à 105 minutes après addition d'arabinose) ont été analysés par PCR avec le couple d'oligonucléotides *dciA1* et *dciA2* (Figure R2A; annexes). Les produits d'amplification correspondant à l'allèle *dciA* sauvage (*dciA*⁺) ou délété du gène *dciA* ($\Delta dciA$) ont été séparés sur gel d'agarose à 1%.

L'expérience a été réalisée sur les cellules YAV20 en phase exponentielle de croissance, cultivées en milieu riche Luria-Bertani à 37°C. Cette culture initiale a été partagée en deux fractions en début d'expérience (temps t0 de l'expérience), et l'une des fractions a été complétée en arabinose 0,02% final (+ara) tandis qu'aucune modification n'a été apportée à l'autre fraction (-ara). Ensuite, à intervalle de temps régulier, des aliquotes de ces deux cultures ont été prélevées afin d'analyser la délétion de *dciA* et la viabilité associée à cette délétion.

La délétion de *dciA* a été estimée par PCR avec le couple diagnostique d'oligonucléotide *dciA1* et *dciA2* (Figure R5A et R5B ; annexes) et la viabilité a été estimée après étalement des échantillons sur milieu non sélectif LB et comptage des colonies après une incubation de 24 heures à 37°C (Tableau R1). Soixante minutes après l'addition de l'arabinose dans la culture, le gène *dciA* a été délété dans la majorité des cellules et le nombre de cellules viables (donnant naissance à une colonie sur milieu solide) a diminué considérablement (Tableau R1). Le nombre de colonies décroît dans la suite de l'expérience (Tableau R1) et la délétion du gène *dciA* est à son maximum 75 min après induction de la recombinaise *Cre* (Figure R5A). Dans ces conditions nous concluons que DciA est essentiel pour *Vibrio cholerae*.

2. Déplétion de DciA dans *V. cholerae*

Chez *Pseudomonas*, la déplétion du gène *dciA* conduit à l'accumulation de cellules contenant 2 ou 4 génomes. Cette observation a conduit à proposer que DciA est essentiel à l'initiation de la réplication (Brézellec *et al.* 2016). Nous avons testé l'hypothèse selon laquelle la délétion de *dciA* aurait le même phénotype chez *V. cholerae*.

Dans un premier temps, nous avons analysé par cytométrie des échantillons de cellules YAV201 (souche dans laquelle nous avons réalisé une immunoprécipitation de chromatine de la protéine DnaB et approfondi, par MFA, l'analyse de la réplication du génome de *V. cholerae*) qui ont été incubés ou non en présence d'arabinose et prélevés à intervalles de temps régulier pendant les 2 heures (à l'instar de la souche YAV20) qui ont suivi l'induction de la délétion du gène *dciA*. Le cytogramme des cellules cultivées en présence

d'arabinose (+ara) (Figure R6) pendant 75 minutes ne montre pas de différences significatives avec celui des cellules à t0. Par contre, une diminution très substantielle de la quantité d'ADN (avec une accumulation importante à 1 génome-équivalent) et de la masse des mêmes cellules incubées pendant 105 minutes suggère que la délétion de *DciA* entraîne un arrêt de la synthèse d'ADN.

Cependant, les cytogrammes des mêmes cellules cultivées sans arabinose (Figure R6) indiquent que les cellules entrent progressivement en phase stationnaire, c.-à-d. que les cellules diminuent en masse et leur quantité d'ADN également. Ainsi, il n'est pas possible de trancher sur les profils de cytométrie des cellules dans lesquelles *dciA* est délété (+ara). Nous concluons que dans ces conditions expérimentales, la comparaison des cytogrammes ne révèle pas de différences entre les cellules déplétées ou non *dciA* (Figure R6).

Plusieurs hypothèses peuvent rendre compte de ce résultat, et en particulier celle d'un décalage temporel entre la délétion de *dciA* et la déplétion de la protéine (DciA). Afin de tester cette dernière hypothèse, nous avons suivi l'évolution de la quantité de la protéine DciA par western blot après délétion du gène et construit pour ce faire une souche fonctionnelle dans laquelle le gène *dciA* est fusionné en 5' avec la séquence codante de l'épitope 3xFLAG (YAV380) (Figure R4).

La quantité de DciA par cellule décroît régulièrement après addition de l'arabinose (Figure R7A). La quantité de DciA à la troisième génération n'est plus que de 5 % celle des cellules sauvages et se stabilise à 1 % de celle des cellules sauvages à partir de la 4^e génération (Figure R7B). Ce résultat confirme l'hypothèse d'un décalage temporel de trois générations entre la délétion de *dciA* et la déplétion de la protéine dans la cellule. Il est donc possible que pendant les 2 premières heures après induction de la délétion de *dciA*, les cellules soient toujours phénotypiquement [*dciA*]+.

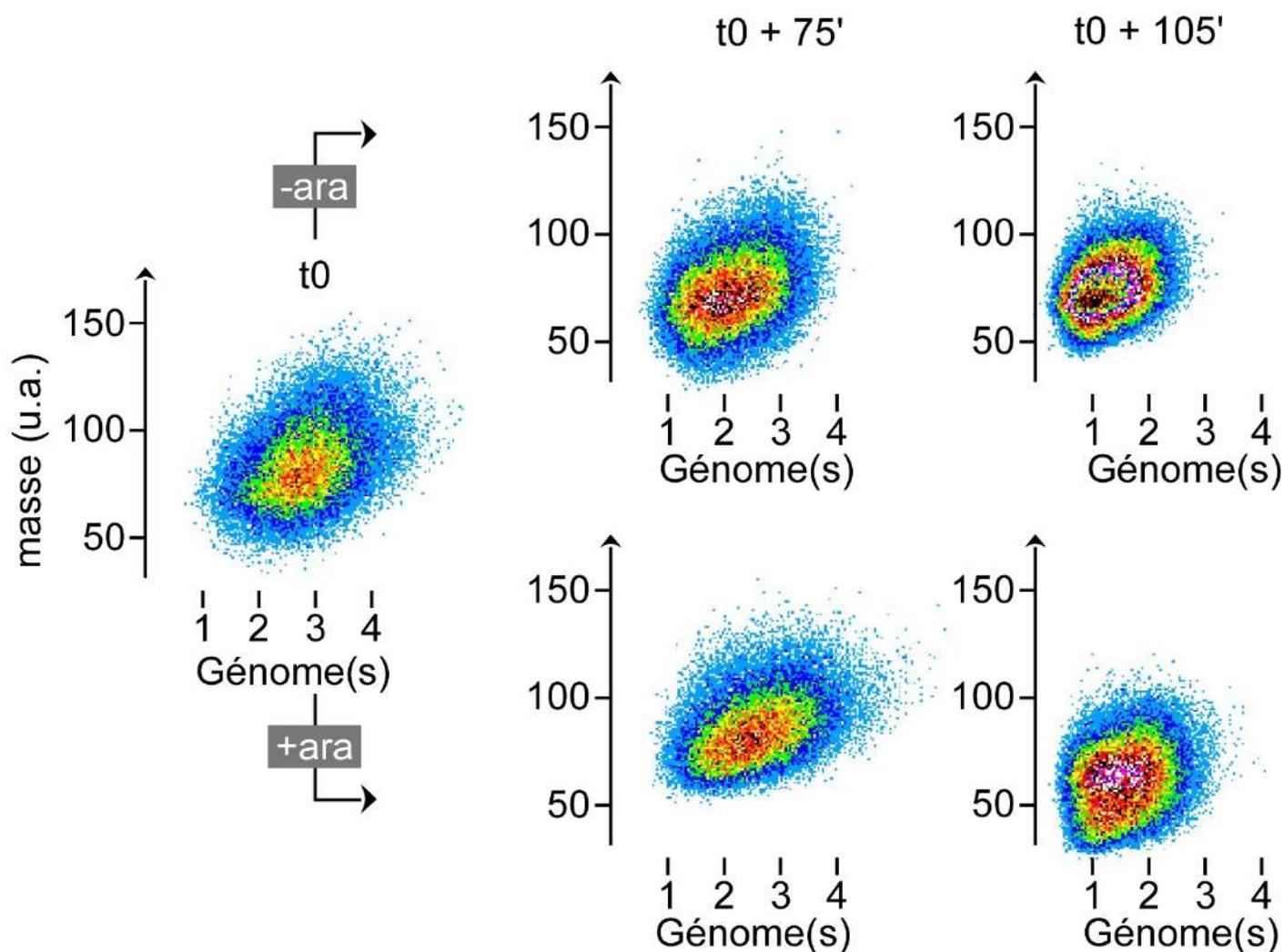


Figure R6. Effet de la délétion de *dciA* sur la croissance cellulaire. Une culture (LB à 37°C) de la souche YAV201 en phase exponentielle de croissance (t_0) est fractionnée en deux. L'une des fractions est supplémentée en arabinose (+ ara) tandis que l'autre est laissée en l'état (- ara). Les deux fractions ainsi générées sont suivies pendant deux heures et des aliquotes sont prélevées à intervalles de temps réguliers sur chacune des fractions pour être analysées en cytométrie en flux. Les profils de cytométrie présentés ici ont été obtenus à partir d'aliquotes prélevées à 75 et 105 minutes traitées à l'iodure de propidium (10 $\mu\text{g/ml}$ final). Le profil de cytométrie des cellules à t_0 est également présenté. La quantité d'ADN (en quantité d'équivalent-génome) est estimée à partir de la quantité de fluorescence associée à l'iodure de propidium (FL3), alors qu'en ordonné la masse cellulaire est représentée par le Forward Scatter (FSC). Sur les profils présentés, un point représente une cellule positionnée selon sa quantité de génome et sa masse; les massifs de points sur chaque profil représentent donc la distribution des cellules pour chaque aliquote analysée. Les degrés de couleurs sont représentatifs de la densité de cellules sur chaque coordonnée (génome; masse). La densité croît selon l'ordre des couleurs qui suit : du bleu au blanc en passant par le vert, le jaune, le rouge et le noir.

3. Caractérisation initiale d'un mutant *dciA*

Nous avons donc modifié notre protocole expérimental de façon à analyser les cellules phénotypiquement [*dciA*]- et ce afin d'analyser l'impact de la perte de la protéine DciA sur la synthèse d'ADN en général par cytométrie de flux, et le recrutement de l'hélicase répliquative sur l'ADN par immunoprécipitation de Chromatine (ChIP). En parallèle, nous avons suivi en « time-lapse » l'évolution de cellules déplétées de *dciA*. Afin d'effectuer ces analyses sur un grand nombre de générations et pour éviter l'entrée des cellules en phase stationnaire, nous les avons maintenues en phase exponentielle continue de croissance en diluant de moitié les cultures à chaque génération.

Dans l'optique d'analyser le recrutement de l'hélicase sur l'ADN, nous avons construit la souche YAV201 et mené le reste de nos expériences sur cette souche. Nous avons suivi la souche YAV201 cultivée en milieu minimum à 30°C en présence d'arabinose au cours de 8 générations. En guise de témoin, nous avons inclus dans l'analyse la même souche cultivée en absence d'arabinose ainsi qu'une souche isogénique, sauvage pour *dciA* (YAV420) (Figure R4) en présence d'arabinose. Le suivi de croissance a été assuré par la mesure de la densité optique (OD₅₅₀) pendant tout le temps de l'expérience (Figure R10B, *haut*).

En absence d'arabinose (Figure R8A, i.e., en conditions de non déplétion de DciA), on observe une prolifération normale des cellules caractérisée par un cycle cellulaire typique de *V. cholerae*. La réplication est initiée dans des cellules de taille homogène contenant une seule *oriC1* localisée au vieux pôle. Suivant la duplication rapide d'*oriC1*, l'une des copies est envoyée vers le nouveau pôle. Finalement, la division sépare cette cellule en deux parties égales (les flèches vertes et le trait blanc illustrent la dynamique d'*oriC1* et la division d'une cellule au cours d'un cycle (David et al, 2014). Après incubation avec de l'arabinose (Figure R8B et R8C, i.e., en conditions de déplétion de DciA), les cellules prolifèrent de façon anormale. On observe des divisions donnant naissance à des cellules dans lesquelles aucun signal de fluorescence correspondant à *oriC1* n'est visible (Figure R8B,

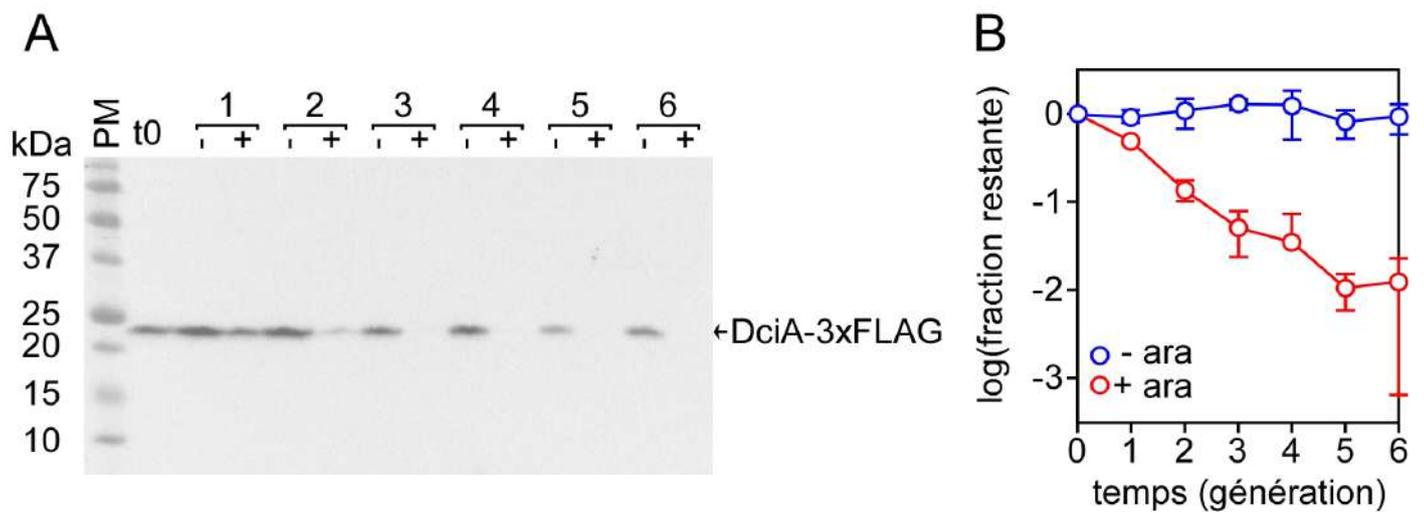


Figure R7. Cinétique de déplétion de la protéine DciA après délétion du gène *dciA*. Une culture de la souche YAV380 en phase exponentielle de croissance (milieu minimum, 30°C) est fractionnée en deux. Dans l'une des fractions, de l'arabinose est ajouté (0,02 % final) pour induire la délétion du gène de fusion *dciA-3xFLAG* (+). Dans l'autre fraction, l'arabinose n'est pas ajouté (-). Des aliquotes de cellules dans chacune des fractions sont prélevées toutes les générations pendant six générations et analysées par western blot pour détecter la protéine de fusion DciA-3xFLAG. **A-** Les cellules sont lysées en tampon de Laemmli (2% SDS, 10% glycérol, 0,002% bleu de bromophénol, 0,0625M Tris-HCl [pH8], 5% β-mercaptoéthanol) incubées à 95°C. et les lysats obtenus sont mis à migrer sur gel dénaturant SDS-PAGE 15%. Les protéines sont ensuite transférées sur membrane de nitrocellulose et la protéine DciA-3xFLAG révélée à l'aide d'anticorps dirigés contre l'épitope 3xFLAG. Les aliquotes analysées à chaque génération (1 à 6) et pour chaque condition (- et +) sont présentés. Une aliquote de la culture YAV380 en phase exponentielle de croissance marquant le début de l'expérience (t0) est aussi analysée. **B-** Les bandes de protéines DciA-3xFLAG ont été quantifiées à l'aide du logiciel BioRad Lab-Software-6.0.1 et rapportée chacune à la quantité de protéine déterminée en début d'expérience (t0) pour déterminer la fraction restante de protéine détectée à chaque génération. L'évolution de cette fraction est représentée au cours des générations pour chacune des conditions de l'expérience (- ara et +ara). PM : Marqueurs de tailles moléculaire ; kDa : KiloDalton.

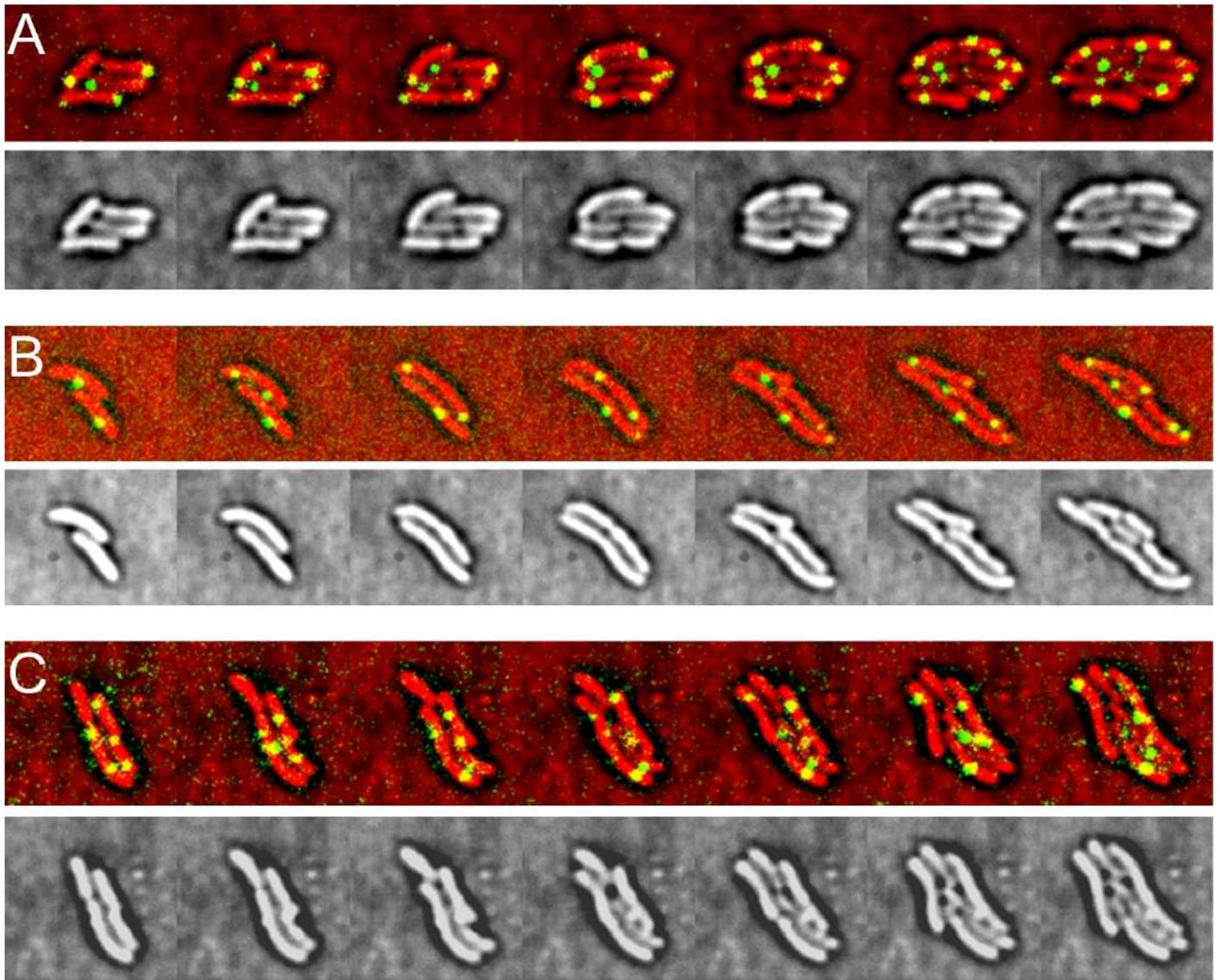


Figure R8. L'initiation de la réplication est bouleversée dans un mutant *dciA*-. Vidéo-microscopie de cellules YAV37 (*LoxP[dciA]*, *cre*, *ori1-lacO*, *lacI-mCherry*) cultivées sur milieu solide M9 Fructose à 30°C après croissance en milieu M9 liquide en absence (A) ou en présence (B et C) d'arabinose (3h à 0.02% final). Images prises à 15 minutes d'intervalle. Le panel supérieur de chaque lignée correspond à la superposition entre le signal de fluorescence vert et le contraste de phase rouge. Le signal fluorescent en vert indique la position de l'origine de réplication du chromosome I de *V. cholerae* (*ori1*). Le panel inférieur correspond uniquement au contraste de phase.

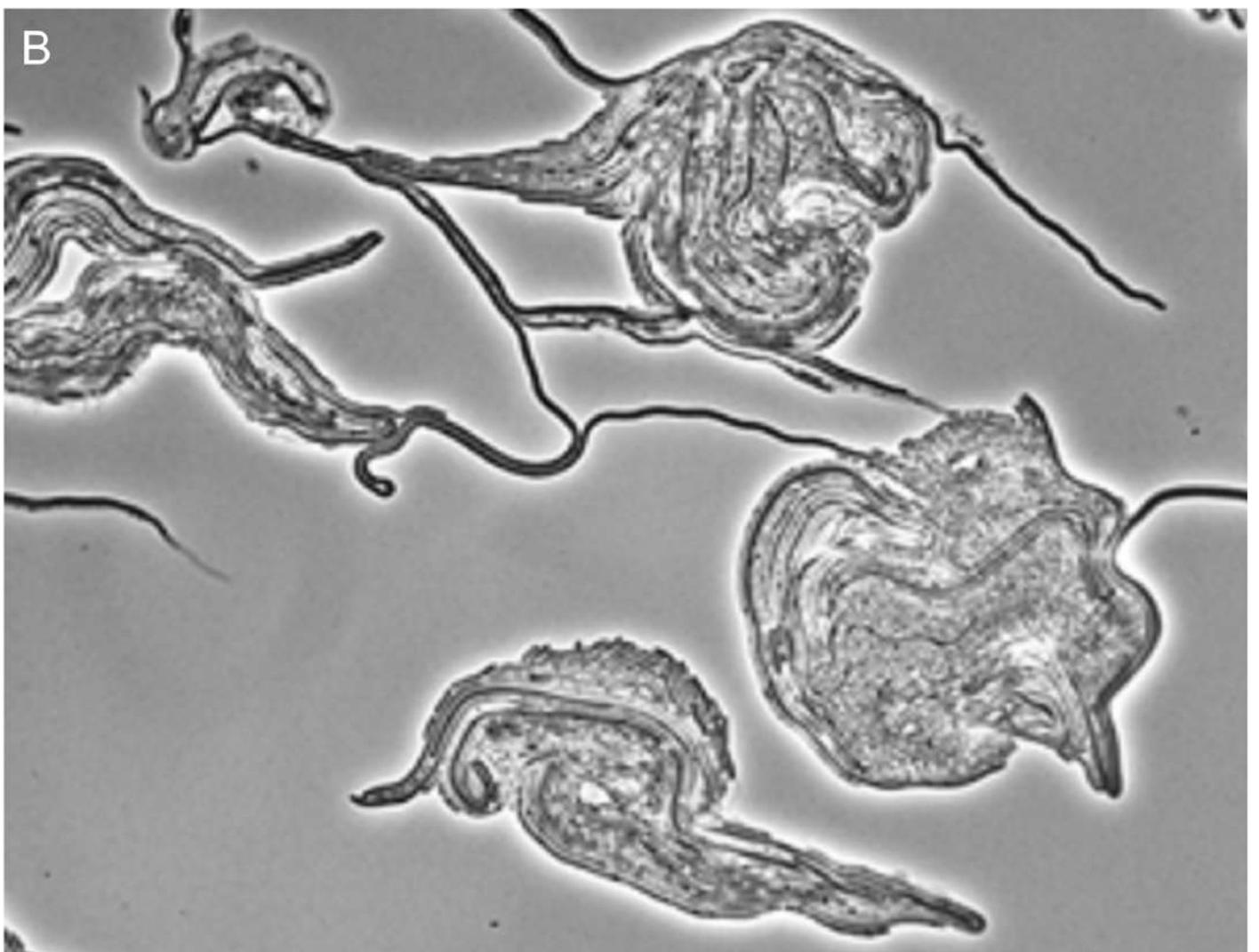
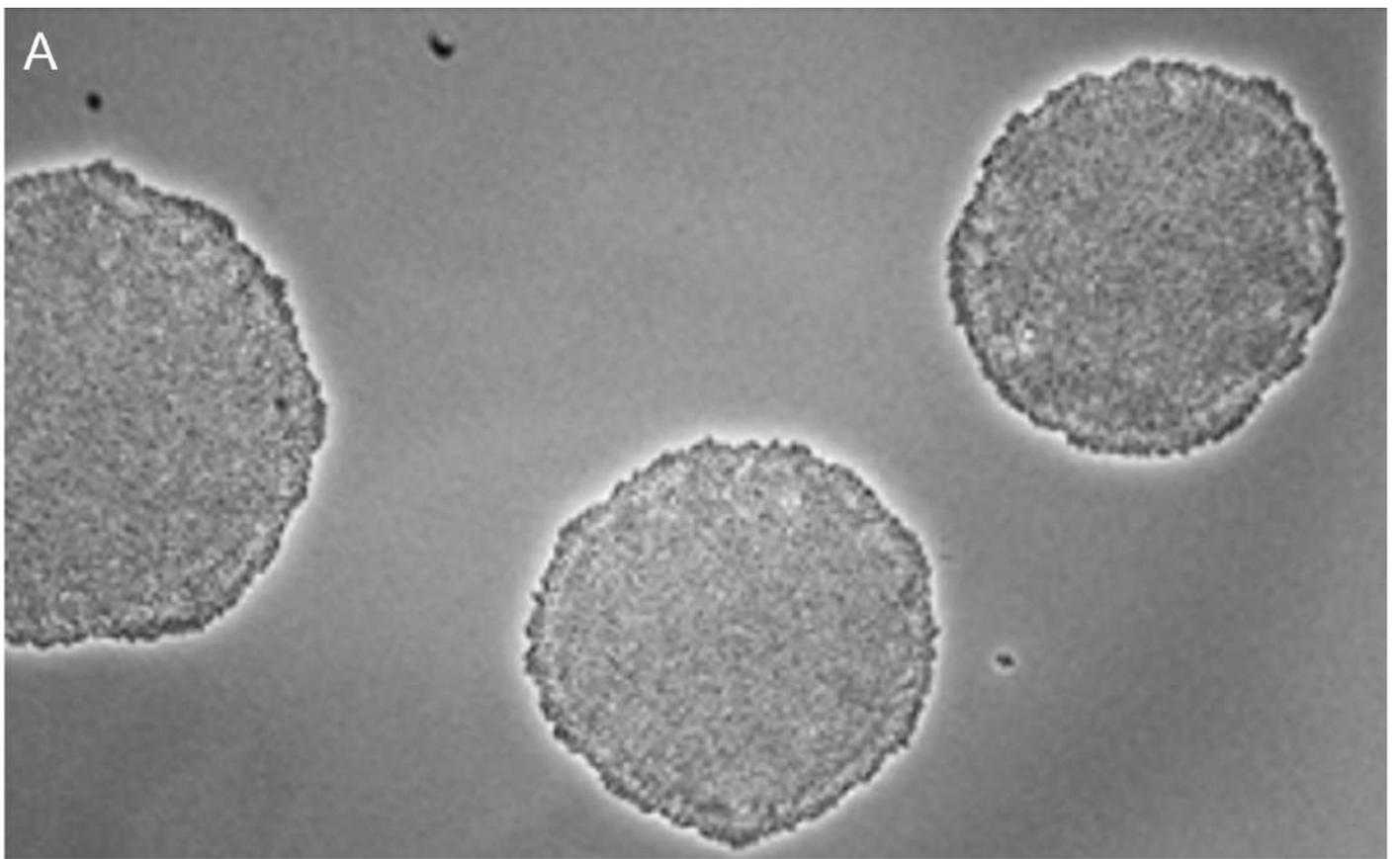


Figure R9. La déplétion de DciA induit de la filamentation. Photos de micro-colonies de cellules YAV20 cultivées 16h sur M9 fructose solide après culture en M9 liquide 16h sans **(A)** et avec **(B)** arabinose à 0.02% final.

cellules marquées par un astérisque) et par une hétérogénéité des événements de prolifération : la duplication d'*oriC1* est observée à des temps très variables après division, et des tailles de cellules très différentes ; la division de la cellule est observée à des temps et des tailles très variables et pas excentrée dans la cellule. On ne peut plus décrire un cycle cellulaire, il n'y a plus de coordination entre la duplication d'*oriC1* et la division cellulaire.

Les cellules ont été cultivées sur une plus longue période (Figure R9). Sans déplétion de DciA (Figure R9A), la microcolonie formée à partir d'une cellule unique est circulaire et est constituée de cellules de taille homogène. Par contre, après une déplétion de DciA de longue durée (Figure R9B), la prolifération cellulaire conduit à la formation de microcolonies hétérogène constituées de taille très hétérogène, allant d'une taille normale à hyper-filamenteuse.

Le profil de cytométrie des cellules YAV201 cultivées en absence d'arabinose (Figure R10A, lignes 1 et 3) ainsi que celui des cellules YAV420 cultivées en présence d'arabinose (données non montrées pour YAV420) reste inchangé pendant toute la durée de l'expérience, indiquant que les cellules cyclent normalement. A l'inverse, le profil de cytométrie des cellules YAV201 cultivées en présence d'arabinose a évolué significativement au cours de l'expérience (Figure R10A, ligne 2 et 4). Durant les trois premières générations (g1 à g3), peu de différences sont notées avec les profils de cytométrie reportant l'évolution de la masse en fonction de la quantité d'ADN obtenus des mêmes cellules cultivées en absence d'arabinose. A partir de la 4^e génération, les cellules contenant 1 ou 2 génomes deviennent majoritaires tandis que la quantité de cellules cyclantes (c.-à-d. situées entre celles à 1 et celles à 2 génomes) diminue ; les cellules contenant 1 ou 2 génomes forment 2 massifs distincts (Figure R10A). Dans ces échantillons, la masse moyenne sur l'ensemble de la population analysée (Figure R10B, *milieu*) ainsi que la distribution des individus autour de la masse moyenne des cellules contenant 1 génome augmente sans cesse avec le nombre de générations (Figure R10B, *bas*). A ce stade, il est difficile de déterminer si ces populations de cellules [*dciA*]- sont composées de cellules cyclantes dans lesquelles les périodes B et

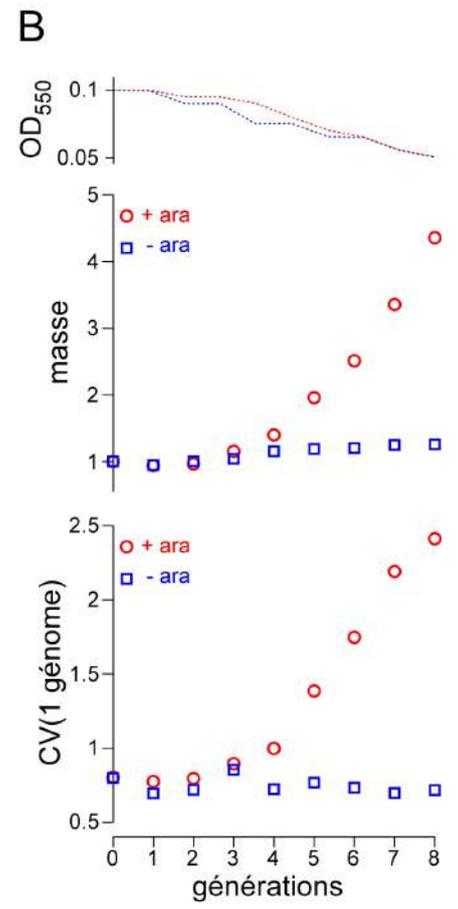
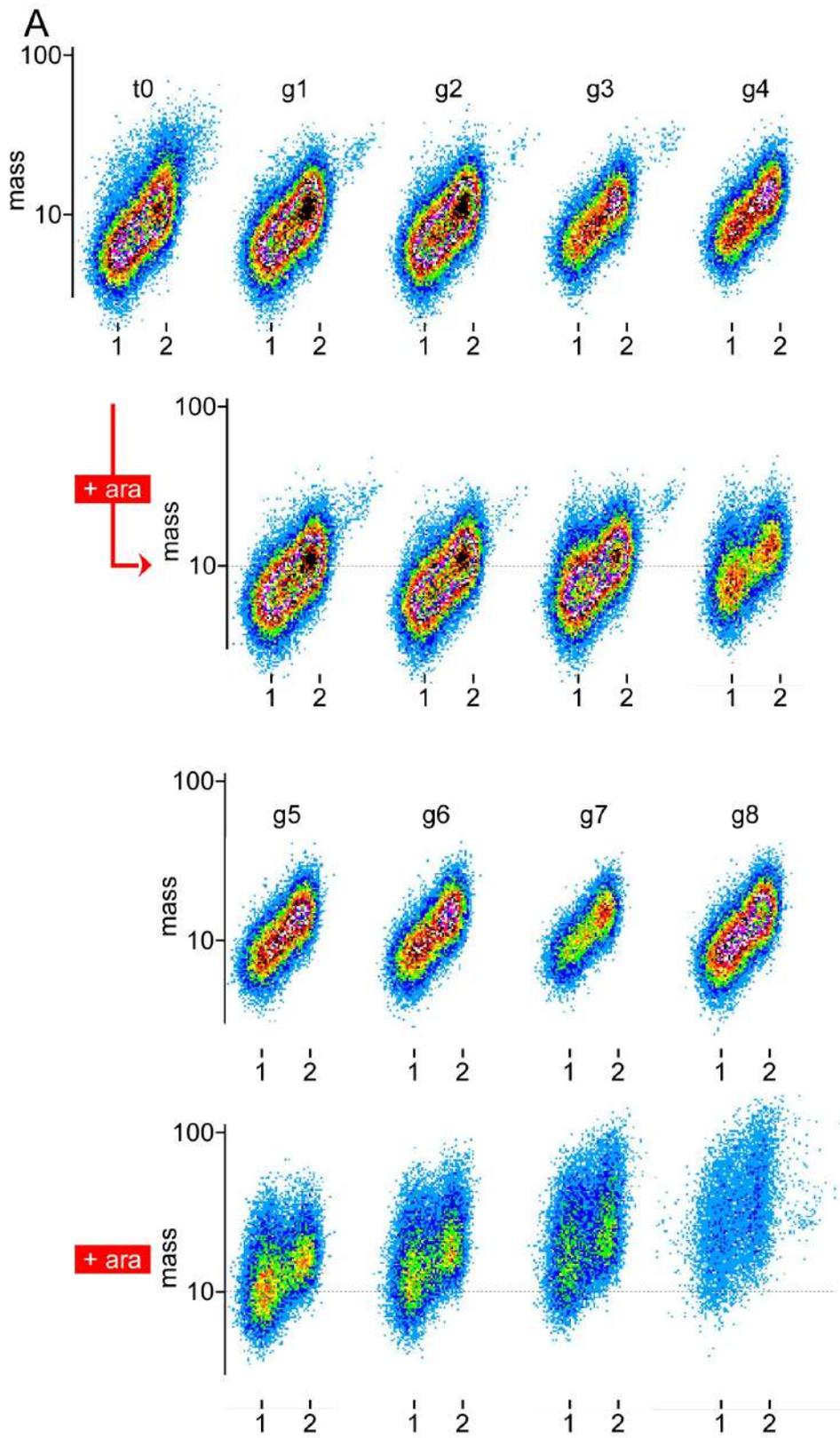


Figure R10. La déplétion de DciA affecte l'initiation de la réplication. **A-** Une culture de la souche YAV201 en phase exponentielle de croissance (t_0) réalisée à 30°C en milieu minimum-fructose (annexes) est fractionnée en deux. Dans l'une des fractions, de l'arabinose est ajouté à une concentration de 0,02 % final (+ara) tandis que l'autre fraction est laissée en l'état. A chaque génération après t_0 (65 minutes), chaque fraction est diluée de moitié afin de maintenir les cellules en phase exponentielle continue de croissance. En parallèle, une aliquote est prise à chaque temps pour être analysée par cytométrie en flux. Les cytogrammes représentent l'évolution de la masse (ordonnée) en fonction de la quantité d'ADN présente dans la cellule (abscisse). Ceux-ci sont donnés pour chaque fraction (+ara, ligne 1 et 3 et sans ara, ligne 2 et 4), au cours des 8 générations successives (g1 à g8). Le cytogramme des cellules à t_0 est aussi présenté. **B - (haut)** La croissance des cultures incubées en présence d'arabinose (ligne pointillée rouge) ou non (ligne pointillée bleue) est mesurée par la densité optique (OD_{550}). (*milieu*) La masse moyenne des cellules déplétées ou non de DciA a été calculée à chaque génération. Cette masse a été calculée sur l'ensemble des cellules présentes dans les cytogrammes. (*bas*) La variance autour de la moyenne a été estimée en fonction de la masse moyenne des cellules contenant 1 génome (coefficient de variation : cv).

Du cycle cellulaire bactérien sont allongées, ou si les cellules sont bloquées. Les cellules YAV201 cultivées en présence d'arabinose sont donc potentiellement réparties entre des cellules cyclantes (dont la quantité d'ADN varie de façon continue entre 1 et 2 génomes) et des cellules bloquées à l'initiation de la réplication (qui possèdent soit 1, soit 2 génomes).

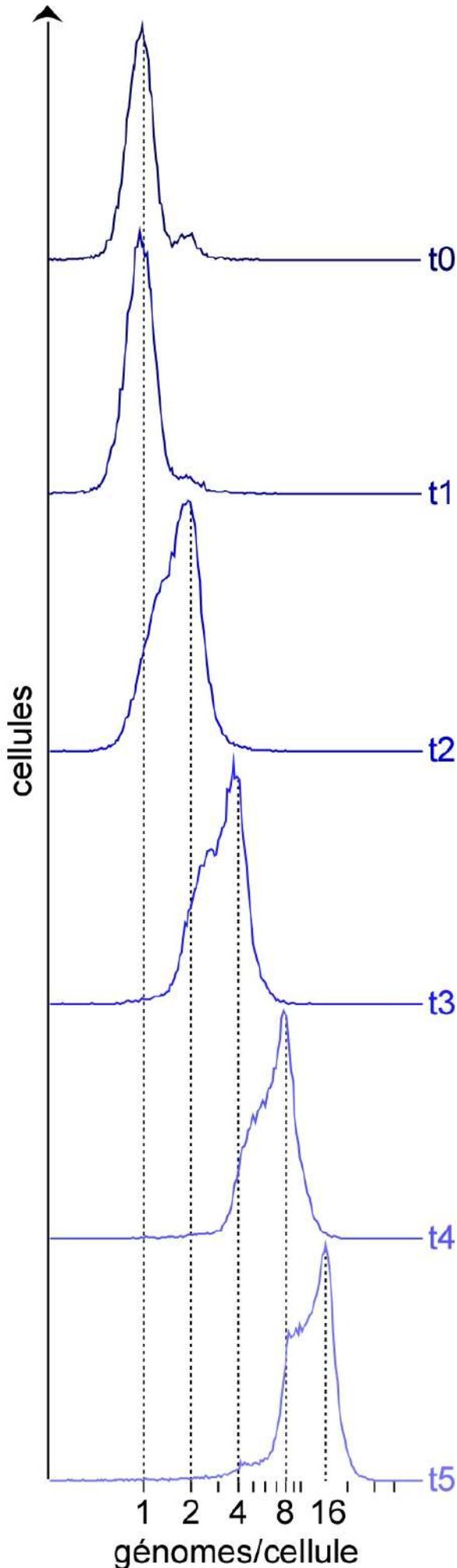
4. L'hélicase répliquative est chargée sur l'ADN en absence de DciA

Un blocage spécifique de la division cellulaire qui n'affecterait pas la réplication de l'ADN pourrait nous permettre de distinguer entre cellules cyclantes ou bloquées à l'initiation de la réplication, et nous aider à déterminer la proportion relative de ces deux types de cellules dans les populations de cellules phénotypiquement [*dciA*]-. Nous avons utilisé la céphalexine afin de bloquer la division cellulaire après avoir vérifié que cet antibiotique n'affectait pas la réplication chez *V. cholerae*. Dans *Escherichia coli*, la céphalexine bloque la division sans affecter la réplication. Nous avons vérifié qu'il en était de même dans les cellules de *V. cholerae*. A cette fin, une culture de nuit de la souche sauvage, YAV17, a été diluée dans du milieu minimum frais (DO₅₅₀ initiale de 0,1). La culture a ensuite été complétée en céphalexine à une concentration finale de 10µg/ml et mise en culture à 30°C. Des échantillons ont été prélevés et fixés à intervalles de temps réguliers (1 génération) pendant 5 générations. Les échantillons ont ensuite été préparés pour une analyse en cytométrie. Il apparaît que la quantité d'ADN par cellule double à chaque génération à partir de la deuxième génération (t₂) et pendant la durée restante de l'expérience (Figure R11). La quantité d'ADN par cellule n'évolue pas entre t₀ et t₁, reflétant vraisemblablement le fait que les cellules ne sont pas encore sorties de la phase de latence. Néanmoins, nous concluons que la céphalexine bloque la division cellulaire sans affecter la réplication dans *V. cholerae*.

Des échantillons de cellules prélevés entre t₀ et g₈ (Figure R10) ont été incubés pendant deux temps de génération en présence de céphalexine. Dans ces conditions, les cellules cyclantes contenant initialement entre 1 et 2

Figure R11. La cephalexine bloque la division sans affecter le programme de répllication dans *V. cholerae*.

Une culture de nuit de cellules sauvages YAV17 a été diluée à une DO_{550} de 0,1 dans du milieu frais et mis en culture à 30°C en présence de cephalexine. A chaque temps de génération (60 minutes) une aliquote de cellules est prélevée. Les cellules sont fixées dans l'éthanol 70%, puis lavées deux fois dans du TE (Tris-HCl [pH 7] 10 mM, EDTA [pH 8] 1 mM), complétées de RNaseA (10 µg/ml) et d'Iodure de propidium (10 µg/ml) et incubées à 37C pendant 1h. La quantité d'ADN par cellule a été suivie pendant 5 générations (t0 a t5).

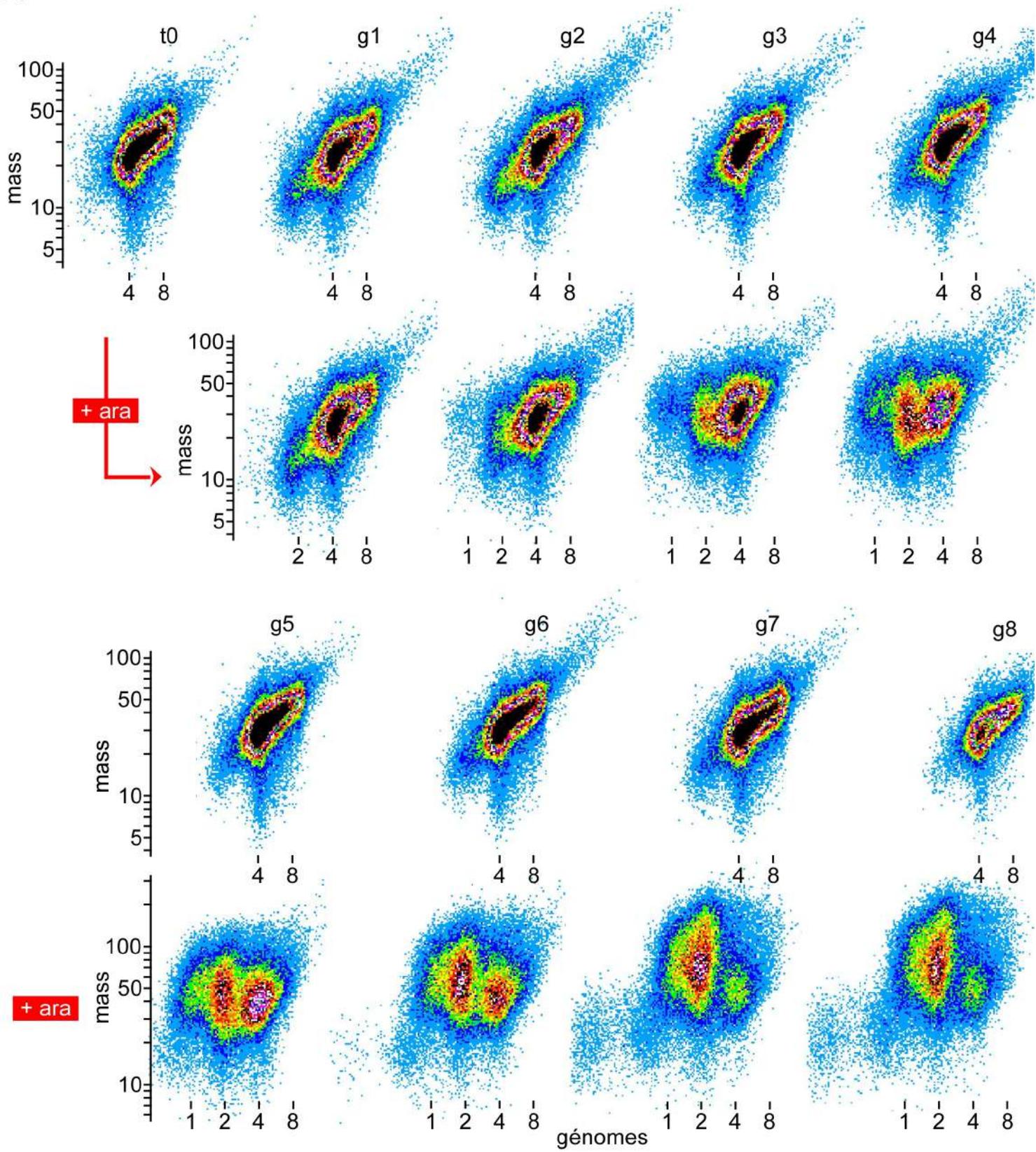


génomomes accumuleraient entre 4 et 8 génomes par cellule alors que les cellules bloquées au stade de l'initiation de la réplication possèderaient toujours un ou deux génomes.

Les cytogrammes des cellules cultivées en absence d'arabinose entre t0 et g8 et incubées pendant 2 temps de génération avec la céphalexine sont identiques ; les cellules contiennent entre 4 et 8 génomes par cellule, reflétant la capacité de ces cellules à répliquer leur ADN sans diviser (Figure R12A, lignes 1 et 3). Les cytogrammes de cellules cultivées en présence d'arabinose puis soumises à la céphalexine évoluent constamment pendant l'expérience (Figure R12A, lignes 2 et 4). A la 3^e génération, un massif de cellules contenant 2 génomes apparaît. Ce massif prend en importance aux générations suivantes jusqu'à devenir majoritaire à partir de la génération g6. Un massif de cellules semblant contenir 1 génome apparaît à la génération g4, mais celui-ci disparaît dès la génération suivante au profit d'un massif de cellules en cours de réplication ; ces cellules contiennent entre 1 et 2 génomes. Il est important de noter que dans ces conditions, il n'y a plus de cellules à 1 génome ce qui implique que toutes les cellules non incubées avec la céphalexine dont la masse augmentait sans que la réplication initie (Figure R10A, ligne 2 et 4), étaient en réalité dans la période B du cycle de réplication.

Etant donné que les cellules YAV201 cultivées en présence d'arabinose sont déplétées en DciA après 3 générations, nous concluons que de l'ADN est synthétisé en absence de DciA. Dans ces cellules, la période B augmente, conduisant à une augmentation de la masse régulière des cellules (Figure R10B, *milieu*). Par ailleurs, la distribution de masse des cellules à 1 génome augmente également avec le temps d'incubation des cellules en arabinose (Figure R10B, *bas*), ce qui indique que la masse à l'initiation est devenue hétérogène dans les cellules [*dciA*]-. Ceci se matérialise par l'accumulation de cellules contenant 2 et 4 génomes lorsque celles-ci ont été incubées en présence de céphalexine (ces cellules proviennent respectivement des cellules à 1 et à 2 génomes dans les échantillons non incubés avec la céphalexine (Figure R12A).

A



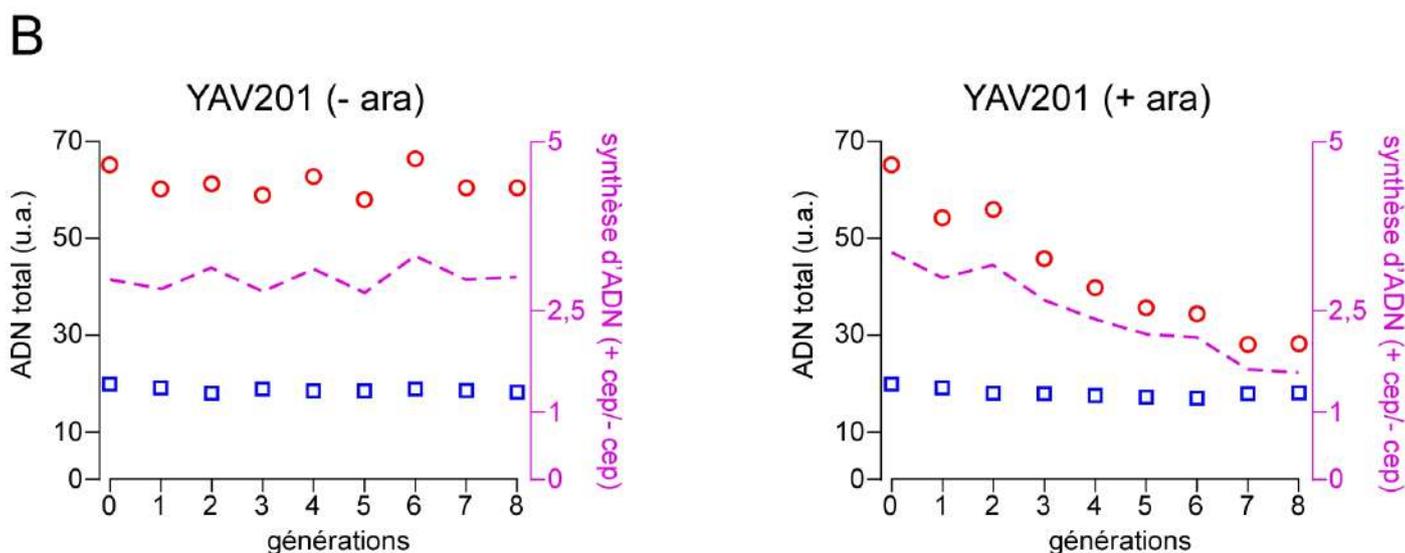


Figure R12. Les cellules *dciA*⁻ peuvent répliquer leur génome. A - Une culture de la souche YAV201 en phase exponentielle de croissance (t_0) réalisée à 30°C en milieu minimum-fructose est fractionnée en deux. Dans l'une des fractions, de l'arabinose est ajouté à une concentration de 0,02 % final (+ara) tandis que l'autre fraction est laissée en l'état. A chaque génération après t_0 (65 minutes), chaque fraction est diluée de moitié afin de maintenir les cellules en phase exponentielle continue de croissance. Des aliquotes de cellules sont prélevées à chaque génération puis incubées pendant 2 temps de génération (soit 130 min) avec de la cephalexine (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ final) afin de bloquer la division cellulaire et suivre l'évolution de la quantité d'ADN pendant cette période. Les populations de cellules sont ensuite analysées par cytométrie en flux. **B** - La quantité d'ADN totale correspondant à chaque génération et condition a été mesurée et reportée pour les 2 conditions YAV201 (- ara) et YAV201 (+ ara). Le rapport entre la quantité mesurée après incubation avec la céphalexine (+ cep, en rouge) et celle mesurée avant (- cep, en bleu) est représenté (ligne pointillée, en mauve).

Nous avons évalué la quantité d'ADN totale synthétisée avant et après incubation des cellules en céphalexine au cours des 8 générations et dans chaque condition analysée. Le rapport entre la quantité mesurée après incubation avec la céphalexine et celle mesurée avant, décroît lorsque DciA est déplétée (Figure R12B).

La synthèse d'ADN étant dépendante de la translocation de l'hélicase en amont de la fourche de réplication, nous concluons également de cette série d'expérience que l'hélicase répliquative est chargée sur l'ADN en absence de DciA. Il n'est pas possible, pourtant, de déterminer si l'hélicase s'est chargée à l'origine de réplication. Afin de répondre à cette question, nous avons combiné une analyse de la fréquence des marqueurs de la réplication (MFA) (Figure R17 et R18) et une immunoprécipitation de chromatine associée à DnaB sur des cultures de la souche YAV201 cultivée en absence ou en présence d'arabinose, ainsi que sur la souche YAV420 (isogénique à YAV201 mais non délétable du gène *dciA*) cultivée en présence d'arabinose (Figure R16).

5. Accumulation de l'hélicase répliquative sur quelques loci génomiques en absence de DciA

Afin de suivre le positionnement de DnaB sur l'ADN, nous avons introduit une étiquette à l'extrémité 3' de la phase codante du gène *dnaB* (*dnaB* est associé à son propre promoteur et a été cloné au site L1 sur le chromosome I de *V. cholerae*). L'étiquette ajoutée contient 9 fois la séquence codante de l'épitope c-Myc, correspondant aux acides aminés C-terminaux (410-419) du proto-oncogène *c-myc* humain (Fernandez *et al.* 2003), qui nous a permis d'immunoprécipiter l'hélicase répliquative ainsi que les séquences d'ADN sur lesquelles elle se trouve. Nous avons ensuite délété la copie endogène du gène *dnaB* dans une souche dans laquelle la délétion de *dciA* est inductible par l'arabinose. La souche YAV201 (Figure R4) ainsi construite est viable et phénotypiquement indistinguishable de la souche isogénique sauvage pour le gène *dnaB* (YAV420); le temps de génération des souches YAV201 et YAV420 est identique (65 minutes pour les 2 souches en milieu minimum-fructose à 30°C (Figure R13A et R13C) et les cytogrammes

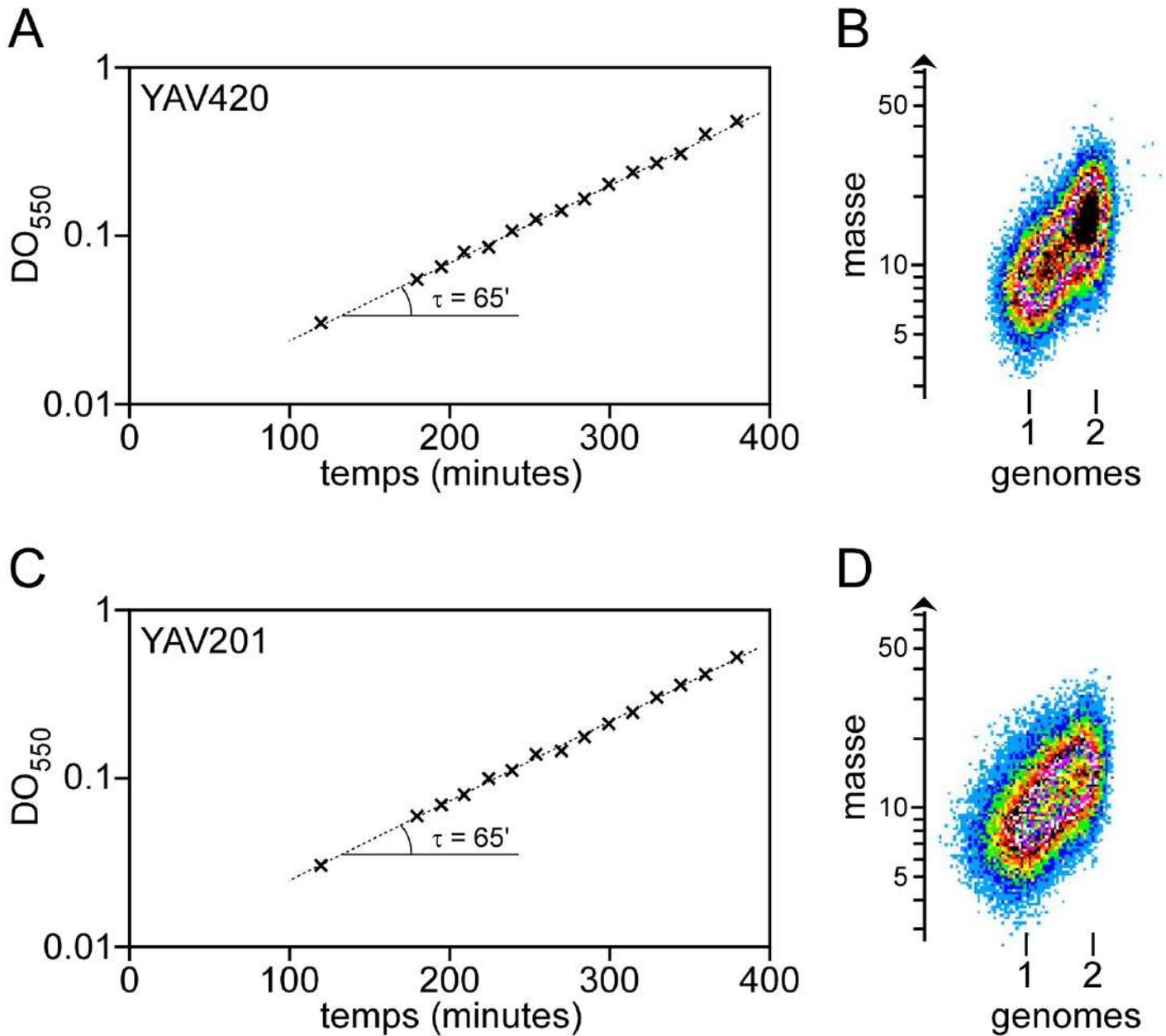


Figure R13. Calcul du temps de génération de YAV201 et YAV420. Les souches YAV420 et YAV201 ont été cultivées à 30°C en milieu minimum-fructose (conditions expérimentales pour l'immunoprécipitation de chromatine). La croissance des cellules est suivie à l'aide de la densité optique (OD_{550}) et par l'acquisition de masse en fonction de la quantité d'ADN. **A et C** - Le temps de génération τ des souches YAV201 et YAV420 est identique. **B et D** - Une aliquote de phase exponentielle de croissance est analysée par cytométrie en flux pour chacune des souches.

des cellules YAV201 et YAV420 ne révèlent aucune différence dans la progression du cycle cellulaire (masse et contenu en ADN) (Figure R13B et R13D).

Dans un premier temps, nous nous sommes assurés que nous pouvions immunoprécipiter la protéine de fusion DnaB-c-Myc. Les cellules YAV201 ont été lysées par sonication à 4°C en tampon non dénaturant afin de maintenir les protéines cellulaires dans leur conformation native et le lysat obtenu a été incubé 3 heures avec des anticorps dirigés contre l'épitope c-Myc, couplés à des billes d'agarose. Les billes sont récupérées par centrifugation pour analyser via SDS-PAGE suivi d'un western blot, la fixation de DnaB-c-Myc aux anticorps liés aux billes. Le surnageant résultant de la centrifugation a également été analysé. Avant la lyse par sonication, nous avons soumis les cellules au paraformaldéhyde qui fixe les liaisons entre protéines et ADN afin de nous rapprocher au mieux des conditions de réalisation de l'immunoprécipitation de chromatine que nous comptons réaliser. Nos résultats montre que nous immunoprécipitons la protéine DnaB-c-Myc (Figure R14A). Deux bandes minoritaires, d'environ 50KDa et 40KDa sont présentes lorsqu'on révèle DnaB ; nous pensons qu'elles résultent vraisemblablement d'une dégradation de la protéine DnaB.

Nous avons ensuite analysé par CHIP, 3 cultures de cellules après 7 générations de croissance en phase exponentielle : les cellules YAV201 cultivées en présence d'arabinose (*[dciA]-, dnaB_c-myc*) et en absence d'arabinose (*[dciA]+, dnaB_c-myc*) ainsi que les cellules YAV420 cultivées en présence d'arabinose (*[dciA]+, dnaB_c-myc*). Après s'être assuré du phénotype associé à la perte de DciA par analyse en cytométrie de flux (Figure R15), nous les avons incubées en présence de paraformaldéhyde (1% final) dans le but de fixer les interactions entre protéines et ADN *in vivo* ; les parois cellulaires sont ensuite digérées au lysozyme pour accéder à l'ADN des cellules qui est ensuite fragmenté par sonication. Une multitude de complexes nucléoprotéiques sont générés parmi lesquels ceux contenant l'hélicase répllicative sont séparés par immunoprécipitation (Figure R14B).

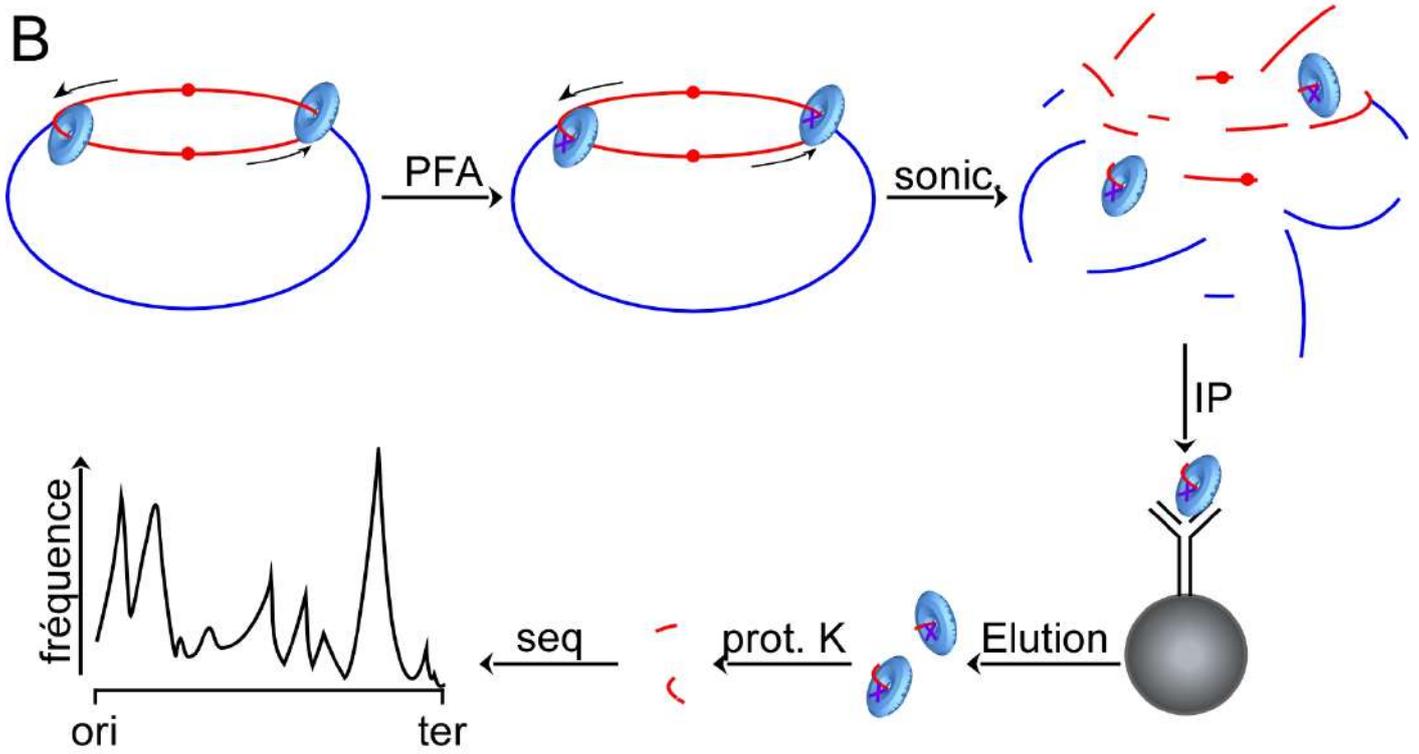
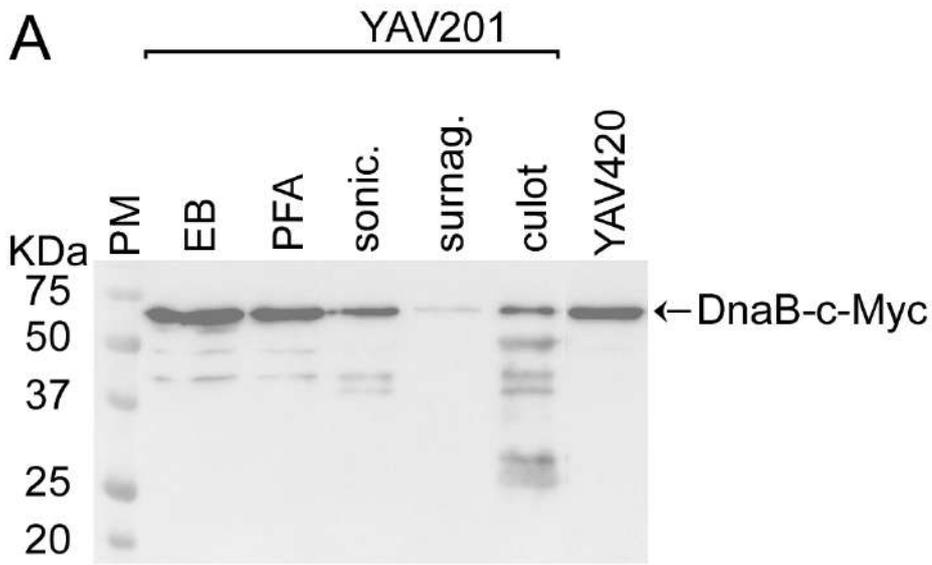
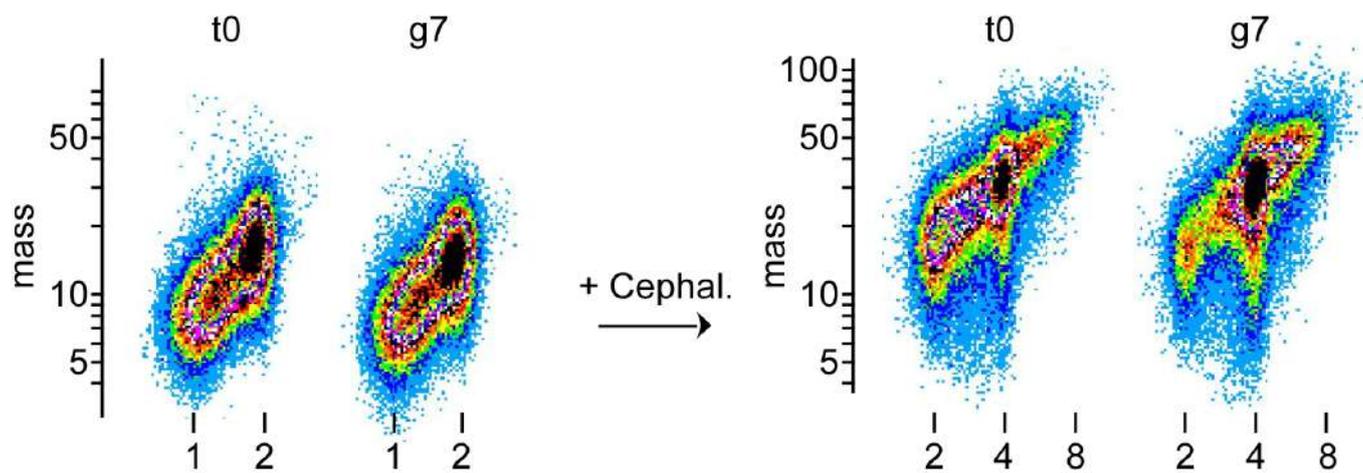


Figure R14. Immunoprécipitation de DnaB. **A** – Détection de la protéine de fusion DnaB-c-Myc par western blot à l'aide d'anticorps dirigés contre l'épitope c-Myc de la souche YAV201. Les échantillons analysés ont été prélevés à différentes étapes durant le test d'immunoprécipitation. EB : extrait cellulaire brut des cellules en croissance, PFA : cellules fixées au paraformaldéhyde, sonic : après sonication. Le culot, contenant les billes (culot) et le surnageant (surnag.) séparés après incubation du produit de sonication avec les anticorps anti-c-Myc fixés aux billes ont été aussi analysés. L'extrait brut de la souche YAV420 a été analysé en parallèle. **B** - Principe de l'immunoprécipitation de chromatine (ChIP). Représentation d'un génome en cours de réplication. L'ADN non répliqué est représenté en bleu alors que celui répliqué est en rouge. Les hélicases réplicatives DnaB (rondelles bleues) positionnées sur le brin à réplication discontinue sont représentées à chaque fourche de réplication. Les interactions entre l'hélicase DnaB et l'ADN sont fixées au paraformaldéhyde (PFA). La sonication fragmente le génome et les complexes nucléoprotéiques contenant DnaB sont immunoprécipités spécifiquement à l'aide d'anticorps anti-c-Myc fixés à des billes d'agarose (boule noire). Les complexes sont ensuite élués et hydrolysés à la protéinase K (prot. K). Les fragments d'ADN purifiés serviront à générer une banque qui sera séquencée afin d'obtenir les régions du génome associées à DnaB.

YAV420 + ara



YAV201

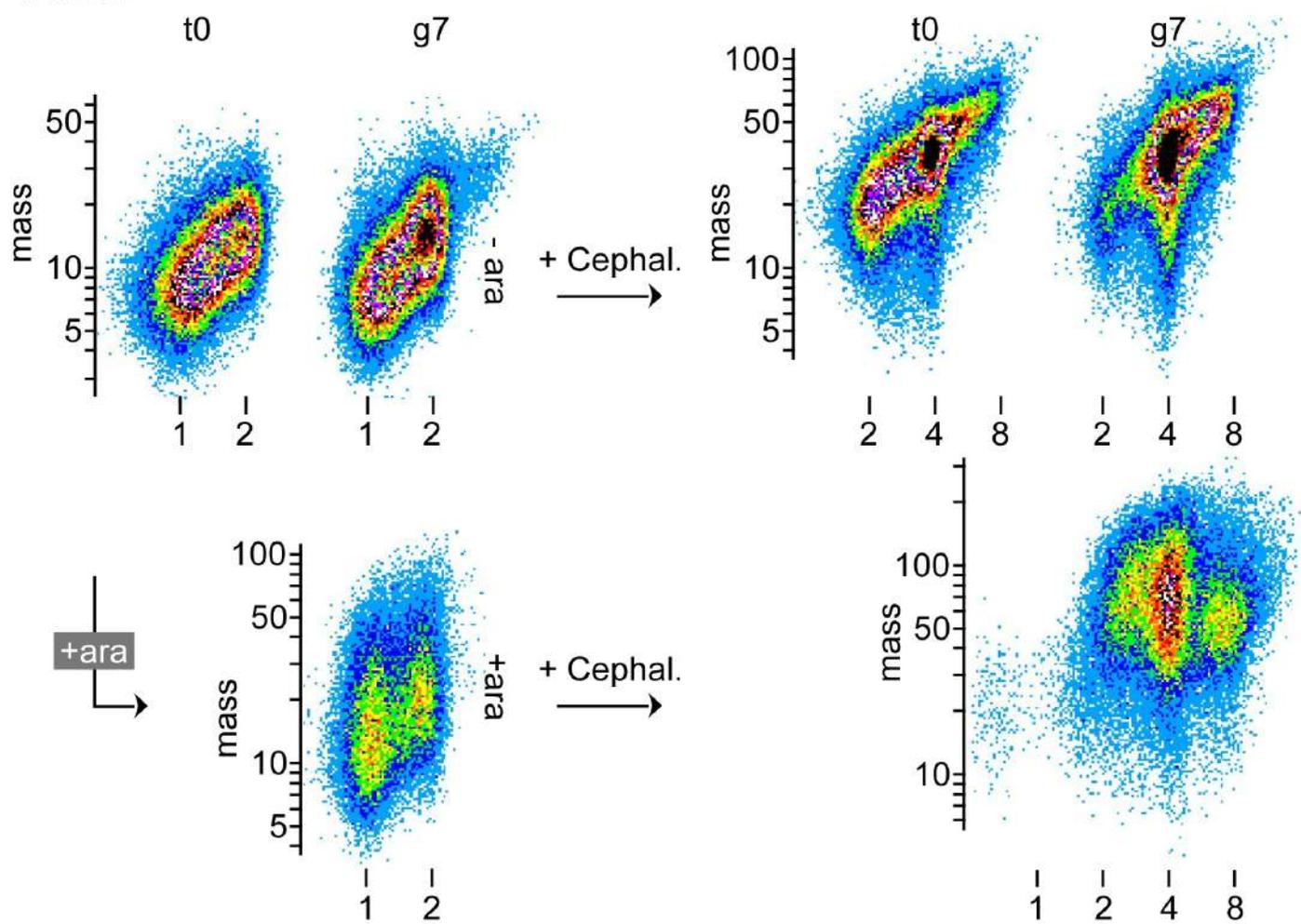


Figure R15. Test de qualité. Les cellules YAV420 cultivées en présence d'arabinose ainsi que les cellules YAV201 cultivées en présence ou en absence d'arabinose ont été maintenues en « steady state » pendant 7 générations (t7), puis incubés en présence de céphalexine pendant 2 générations. Des échantillons de ces cellules à t0 et t7 incubées ou non en présence de céphalexine, ont été analysés par cytométrie en flux. Les cytogrammes des cellules YAV420 (+ara) et YAV201 (-ara) sont identiques et se distinguent clairement de celui des cellules YAV201 cultivées en présence d'arabinose.

La fraction protéique des complexes ADN-hélicase est ensuite hydrolysée par la protéinase K et les fragments d'ADN restants sont purifiés puis amplifiés afin de générer une banque. Celle-ci est séquencée afin de déterminer les zones de fixation de l'hélicase répliquative (ChIP). La présence de l'hélicase DnaB sur l'ADN génomique est révélée après séquençage qui a permis en outre d'estimer la fréquence à laquelle les régions du génome sont associées à DnaB. Une banque a également été réalisée sur des fractions dans lesquelles DnaB n'a pas été immunoprécipité (Input), de façon à discriminer les biais d'enrichissement des loci génomiques en absence de DciA (YAV201 cultivée en présence d'arabinose) ou produits simplement du fait de la présence d'arabinose (YAV420 cultivée en présence d'arabinose).

La normalisation (ChIP/Input) des fréquences est établie pour les trois cultures : YAV201 (+ara), YAV201 (-ara) et YAV420 (+ara). Les profils normalisés des cultures YAV201 (-ara) (Figure R16A, courbe noire/verte) et YAV420 (+ara) (non montrées) semblent identiques, ce qui est confirmé par l'analyse du rapport entre les 2 profils qui demeure constant sur toute la longueur du chromosome (Figure R16B, bas). Ceci indique que la présence d'arabinose n'affecte pas le profil de fixation de DnaB sur l'ADN. Ainsi nous pouvons déterminer le profil de fixation de DnaB sur la chromatine de *V. cholerae* en absence de DciA en analysant les cellules YAV201 incubées en présence d'arabinose.

L'hélicase répliquative est processive et transloque le long de la molécule d'ADN jusqu'à la terminaison de la réplication. En ce sens, elle ne doit présenter aucune spécificité pour les séquences génomiques auxquelles elle pourrait être associée. Nous nous attendions donc à un profil dans lequel la fixation de DnaB serait homogène sur toute la longueur du génome dans les cellules sauvages. C'est effectivement ce que nous observons (Figure R16A, YAV201 -ara). La situation observée est différente lorsque la culture YAV201 (+ara) est analysée (Figure R16A, courbe bleu/rouge). Pour plus de clarté, nous avons également rapporté les normalisations obtenues à partir des cultures YAV201 (+ara) à celles obtenues à partir de la culture YAV201 (-ara) (Figure R16B, haut). En absence de DciA, des pics d'enrichissement sont identifiés sur le génome. Ces pics sont soit très

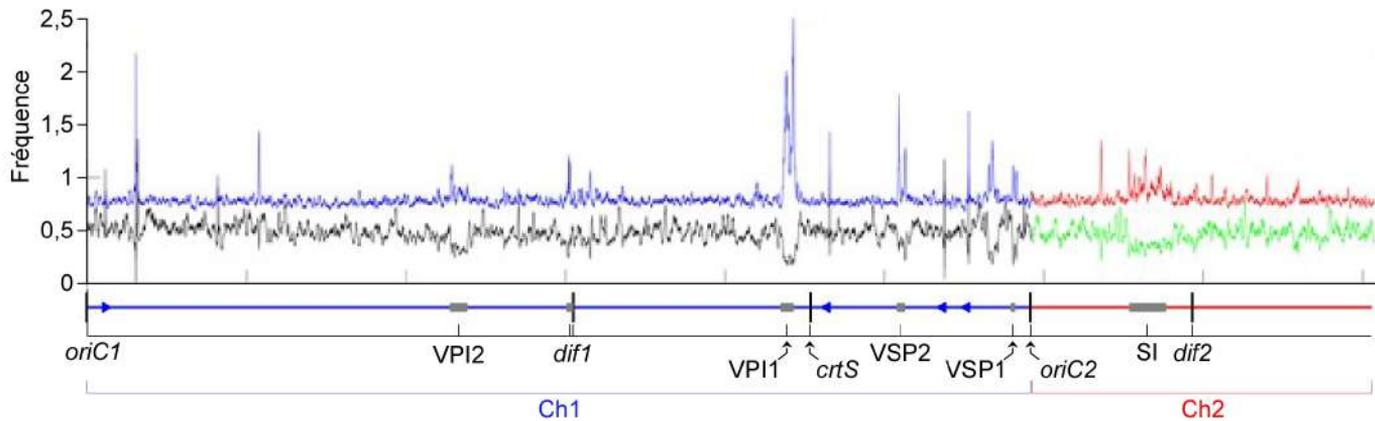
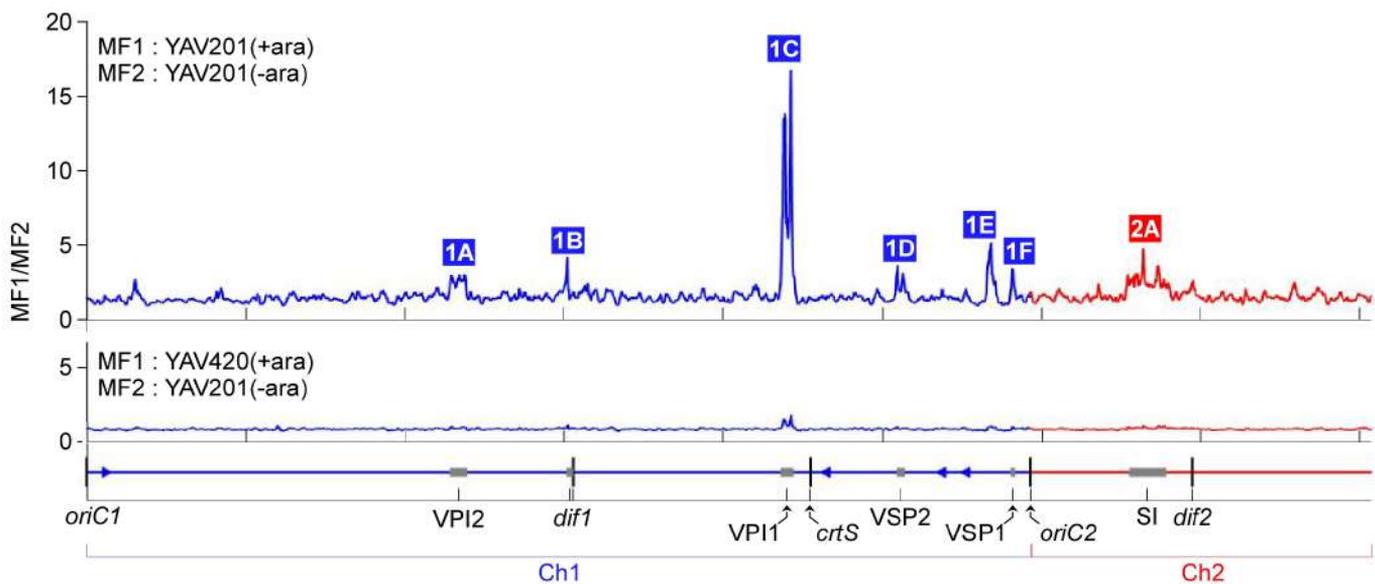
A**B**

Figure R16. Distribution de VcDnaB sur le génome de *V. cholerae* en présence et en absence de DciA. **A** - La souche YAV201 a été cultivée à 30°C en milieu minimum + fructose (annexes). Après 7 générations d'incubation en présence ou en absence d'arabinose, les ADN associés à l'hélicase DnaB ont été immunoprécipités et séquencés. Pour une culture donnée, la fréquence représente le rapport entre le nombre de fragments d'ADN immunoprécipités et celui présent dans la même culture avant immunoprécipitation (input). Les éléments remarquables sur les chromosomes 1 et 2 sont représentés en abscisse. **B** - Les fréquences d'ADN immunoprécipités issues des cultures analysées de YAV201 (+ara) (en haut) et YAV420 (+ara) (en bas) sont rapportées à celles de YAV201 (-ara) de façon à révéler les sites de fixation dont l'enrichissement est significativement différent entre la souche dciA- et les souches contrôles. Ces pics sont identifiés par un chiffre (chromosome) et leur emplacement sur le génome.

localisés (1A, 1B, 1C, 1D, 1E, 1F et 2A). Par contre, l'analyse des ADN co-immunoprécipités avec DnaB-c-Myc ne révèle aucun enrichissement des régions *oriC1* et *oriC2* dans un mutant [*dciA*]-. Ceci nous permet d'exclure l'hypothèse qu'en absence de DciA, une fraction des hélicases chargées au niveau des origines de réplication soit inactive et soit restée associée à ces régions. Il apparaît que les régions du génome auxquelles DnaB est fortement associé dans les cellules [*dciA*]- contiennent : les îlots de pathogénicité VPI-1 (1C), VPI-2 (1A), et VSP-1 (1C) et VSP-2 (1F) et le super intégron du chromosome II (2A) (Figure R16B). Les cinq autres régions ne possèdent pas de caractéristiques remarquables.

La synthèse d'ADN mesurée (cytométrie) et les profils de ChIP obtenus lorsque les cellules sont déplétées en DciA suggèrent que dans ces conditions l'hélicase s'est chargée sur l'ADN et qu'elle a prévalu à la formation d'un réplisome actif. L'existence de loci génomiques particuliers sur lesquels l'hélicase s'accumule lorsque les cellules sont déplétées en DciA indique les sites sur lesquels l'hélicase et vraisemblablement le réplisome a pausé ou ralenti pendant la réplication de ces régions du génome.

6. Initiation de la réplication en absence de DciA

Les ADN « Input » qui nous ont servi à déterminer les biais d'enrichissement de loci génomiques dans l'analyse de ChIP, peuvent nous permettre également de déterminer la fréquence des marqueurs du génome de *V. cholerae*, et donc de suivre le processus de réplication. Nous pouvons ainsi calculer l'enrichissement des séquences correspondant aux deux origines (*oriC1* et *oriC2*), et conséquemment déterminer si la réplication observée dans les cellules [*dciA*]- a été initiée aux origines de réplication des chromosomes 1 et 2 ou ailleurs. Il est également possible d'estimer la synchronie d'activation des 2 fourches de réplication (RF) en mesurant les pentes associées à la synthèse des 2 réplichores. Dans les cellules YAV201 (-ara), les marqueurs sont distribués sur chaque chromosome selon un profil typique de cette espèce. Au sommet, on retrouve les régions génomiques

présentes avec la fréquence la plus élevée, c'est-à-dire les origines de réplication du génome, *oriC1* et *oriC2*. Quant aux séquences dont la fréquence est la plus faible, elles indiquent les régions génomiques où les 2 fourches de réplication se rencontrent lors de la terminaison de la réplication. Nos résultats indiquent que les 2 fourches de réplication se rencontrent lorsque les 2 réplichores ont synthétisés à peu près la moitié du génome (Figure R17, haut). La pente associée à la synthèse du réplichore droit est tout à fait comparable à celle du réplichore gauche, suggérant que l'activation des 2 fourches est relativement synchrone. Nous avons également analysé la distribution des fréquences de marqueurs génomiques des cellules issues des cellules YAV420 incubées en présence d'arabinose, et nous n'avons pas trouvé de différences significatives entre les deux séries de données (données non montrées).

Dans les cellules YAV201 incubées en présence d'arabinose, la situation est très différente (Figure R17, bas). Quoique la distribution des fréquences de marqueurs génomiques de ces cellules confirme la synthèse d'ADN en absence de DciA, la distribution des marqueurs génomiques se distingue très nettement de celle des 2 souches contrôles. En particulier, les pentes des 2 réplichores au niveau de la région terminus sont différentes ($-2,8 \cdot 10^{-7} \log_2[\text{MF}] \cdot \text{nucl}^{-1}$ pour le réplichore droit et $1,7 \cdot 10^{-7} \log_2[\text{MF}] \cdot \text{nucl}^{-1}$ pour le réplichore gauche) et très inférieures à celles mesurées dans les mêmes cellules en absence d'arabinose (Figure R17, haut). Cette différence peut indiquer un déficit de réplication ou un retard dans l'activation de la fourche de réplication correspondant au réplichore gauche dans les cellules déplétées en DciA. En accord avec un déficit de réplication et/ou un retard d'activation de la fourche correspondant au réplichore gauche, le site au niveau duquel les 2 fourches se rencontrent en fin de réplication est très significativement délocalisé dans le réplichore gauche, à environ 150 kb du site observé pour les cellules YAV201 cultivées sans arabinose. Curieusement, la réplication du chromosome 2 est plus modérément affectée par l'absence de DciA. L'analyse des pentes associées au réplichore droit et gauche ne révèle pas de différence significative. Toutefois, et comme nous

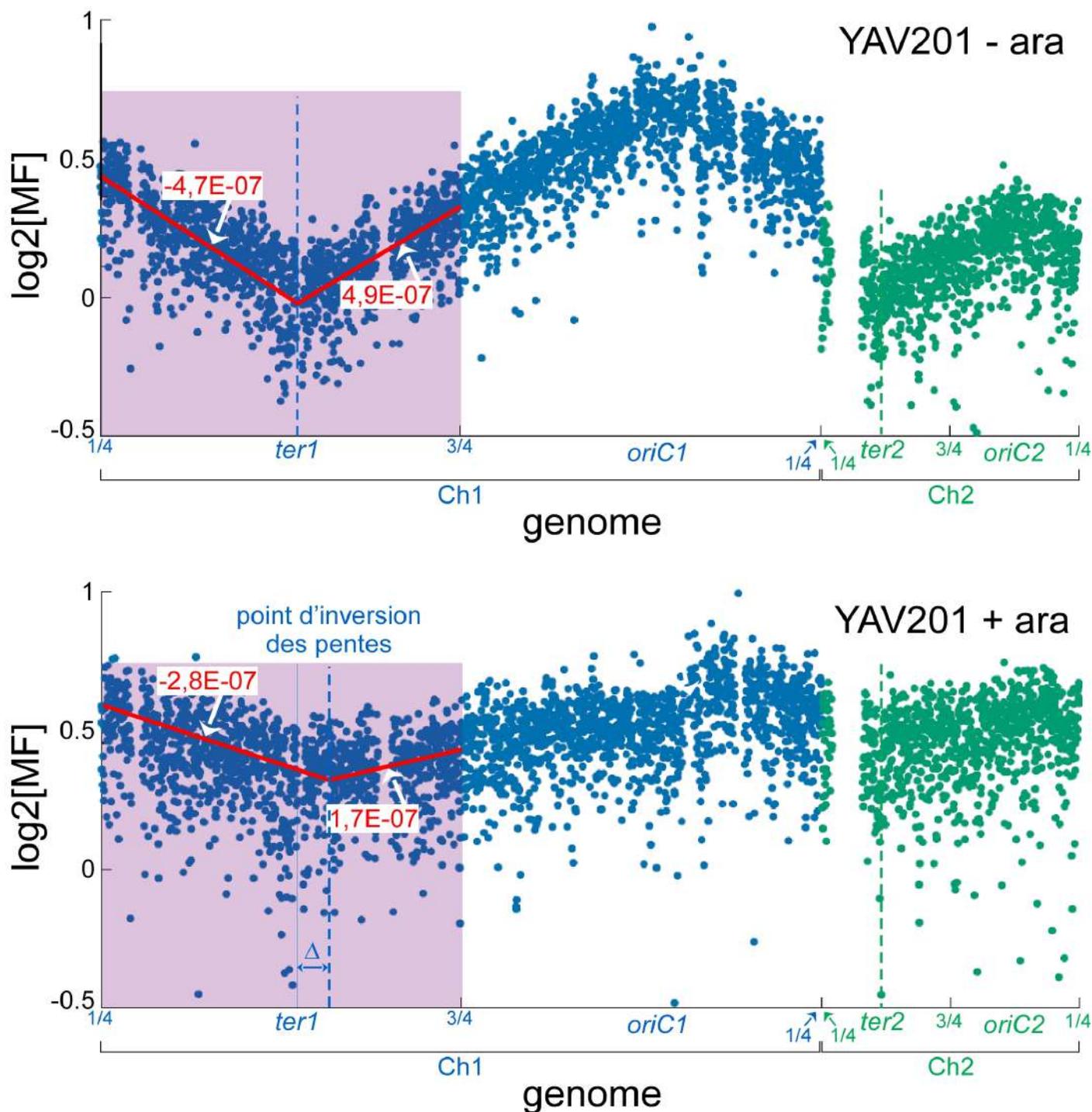


Figure R17. Déficit de réplication du réplicore droit dans un mutant *dcIA*: Analyse de la fréquence des marqueurs du génome de YAV201 cultivées pendant 7 générations en absence (haut) ou en présence d'arabinose (bas). La partie correspondant au chromosome 1 est en bleu et celle correspondant au chromosome 2 est en vert. Le log de la fréquence des marqueurs est donné en ordonnée à chaque position du génome (en abscisse). Les origines des 2 chromosomes (*oriC1* et *oriC2*) de même que les sites de terminaison où les fourches de réplication convergent (*ter1* et *ter2*) sont indiquées. Les sites situés au $\frac{1}{4}$ et $\frac{3}{4}$ du génome sont également repérés. Les pentes (sections en mauve) (en $\log_2[\text{MFI}]/\text{nt}$) correspondantes à la synthèse des 2 réplicores dans les deux conditions de croissance (- ara et + ara) de même que le décalage du site de terminaison de la réplication du chromosome 1 dans la culture *dcIA*- sont indiquées (Δ).

l'avions noté pour le chromosome I, la déplétion de DciA résulte en un taux de synthèse du chromosome II nettement plus faible que celui observé dans des cellules isogéniques sauvages (Figure R17).

Nous nous sommes ensuite intéressés à la distribution des marqueurs au niveau des origines de réplication. A nouveau, nous n'observons pas de différence notable au niveau de l'initiation de la réplication du chromosome II. La situation est radicalement différente au niveau de l'origine de réplication du chromosome I. Par définition, ce site génomique est celui au niveau duquel la fréquence des marqueurs doit être la plus élevée, comme le met parfaitement en exemple le profil obtenu avec la culture YAV201(-ara) (Figure R18, haut). Pourtant, le locus génomique le plus représenté sur le chromosome I n'est pas centré sur *oriC1*, mais décalé d'environ 350 kb sur le réplichore droit dans les cellules YAV201 (+ara) (Figure R18, bas). Avec une amplitude moindre, un changement de pente est également visible sur le réplichore gauche à 200 kb d'*oriC1* (Figure R18, bas). Ces résultats renforcent l'hypothèse d'une moindre efficacité de la réplication du réplichore gauche. En réalisant une analyse comparée des chromosome I et II, nous notons également que la fréquence des marqueurs correspondant à la région terminus du chromosome II est significativement supérieure à celle des marqueurs de la région terminus du chromosome I, suggérant une perte de coordination dans le programme de réplication des 2 chromosomes de *V. cholerae* en absence de DciA.

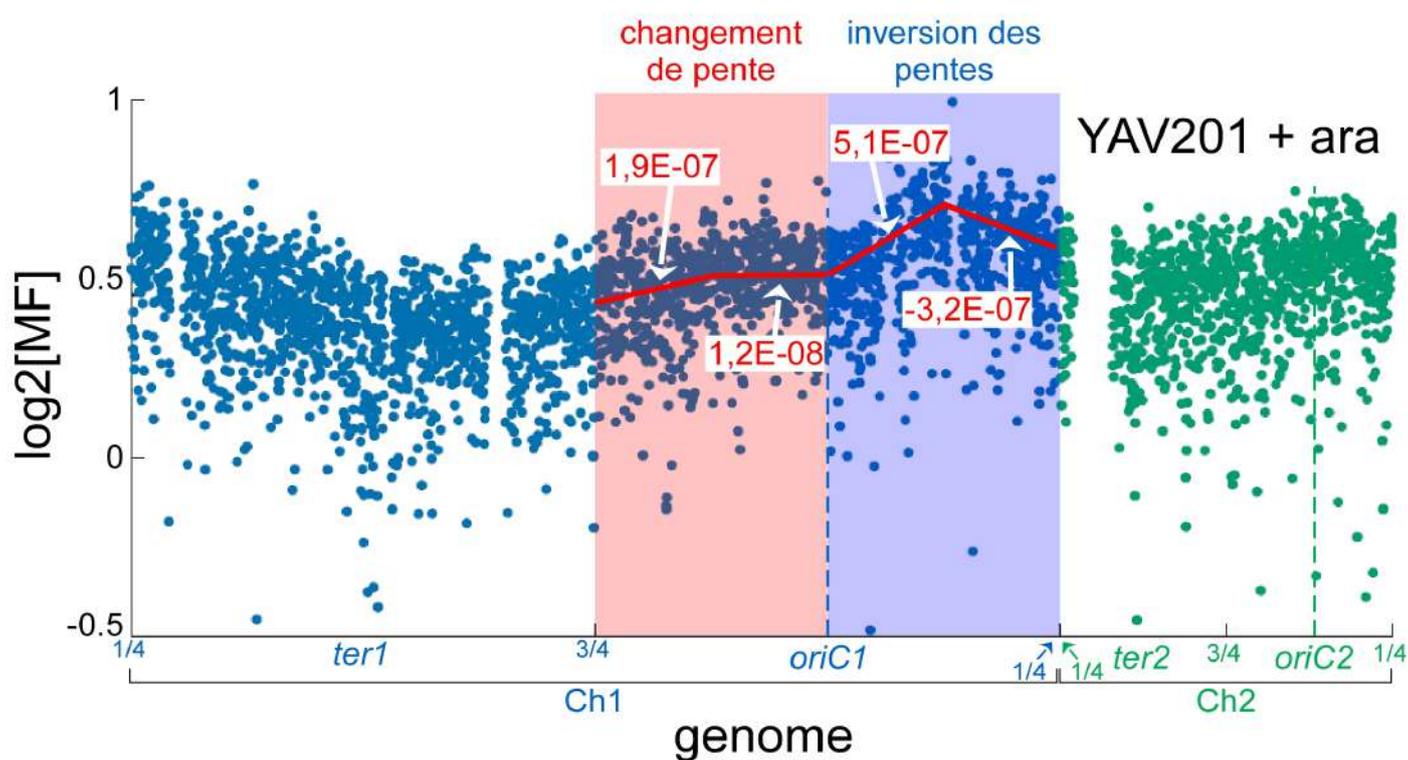
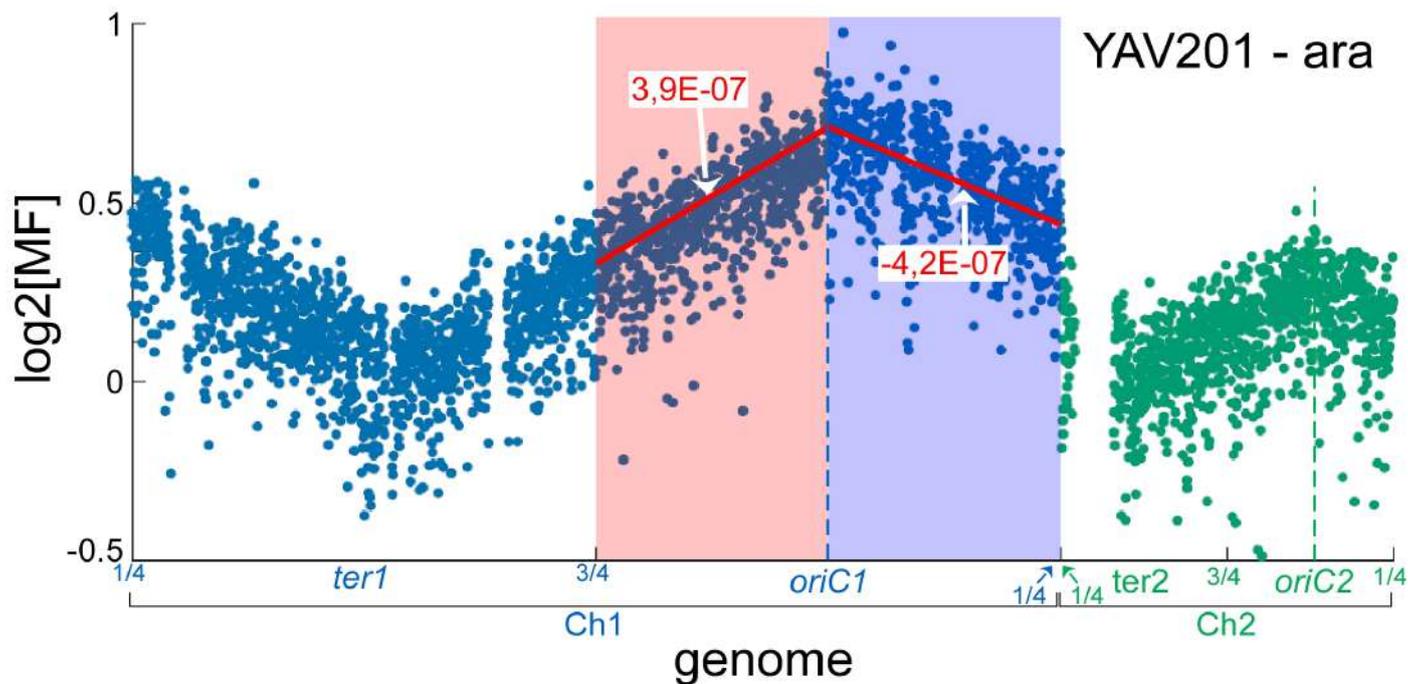


Figure R18. Initiation de la réplication en absence de DciA. L'analyse de la fréquence des marqueurs des souches YAV201 (-ara) et YAV201 (+ara) est la même que celle présentée dans la figure R10. Les pentes (courbes rouges) représentent la moyenne des fréquences de marqueurs obtenus au niveau de l'origine de réplication pour le réplicore gauche (rouge) et droit (bleu).

Partie III. Remplacement DciA par DnaC/DnaT

La domestication récurrente des gènes *dnaC/dnaI* (*dnaC/I*) dans le domaine bactérien s'est systématiquement faite au détriment de *dciA* (Brézellec et al. 2016). Ce résultat nous avait tout d'abord conduit à proposer que DnaC et DciA spécifient des activités similaires et que la fonction des deux types de protéines soit conservée. Tout au moins, ces domestications fréquentes de *dnaC/I* suggèrent qu'un nombre très limité de modifications adaptatives sont suffisantes pour un remplacement efficace et fonctionnel de *dciA*. Ces modifications nous intéressent car elles doivent toucher des gènes impliqués dans la ou les fonctions de DciA, et pas exclusivement les facteurs interagissant physiquement avec cette protéine. Nous allons donc tenter de remplacer le gène *dciA* de *V. cholerae* par le gène *dnaC* d'*E. coli* - un remplacement qui pourrait mimer celui qui a prévalu à la fixation de *dnaC/I* dans les Entérobactéries - afin d'identifier l'apparition au cours du temps des adaptations qui ont conduit à la fixation de *dnaC*.

Le gène *dnaT* est toujours en opéron avec le gène *dnaC* dans le domaine bactérien, que l'opéron soit résident ou mobile, c'est-à-dire associé à un génome phagique (Brézellec et al. 2016). Le gène *dnaT* a été peu étudié. Nous savons que le produit de ce gène est nécessaire pendant la réactivation des fourches de réplication avortées - et plus précisément lorsque l'hélicase répliquative est recrutée par le primosome. Toutefois, DnaT est dispensable pendant l'initiation, suggérant que sa fonction ne se limite qu'à la réactivation des répliquations avortées. Nous avons donc conçu deux stratégies expérimentales. Dans l'une, seul le gène *dnaC* sera introduit dans *V. cholerae*, tandis que dans l'autre, l'opéron entier *dnaCT* sera testé.

Nous avons transformé la souche YAV20, par les plasmides pREP726 et pREP727 contenant pour le premier le gène *dnaC* et pour le second l'opéron *dnaCT* afin générer respectivement les souches YAV357 souche YAV360. Dans les constructions utilisées, le gène *dnaC* ou l'opéron *dnaCT* sont placés sous contrôle d'un promoteur inductible à l'arabinose (pBAD). Ainsi, dans ces souches, l'addition d'arabinose dans la culture conduit à l'expression de DnaC ou des protéines DnaC et DnaT de façon concomitante à la délétion

du gène *dciA*. Les souches ont été construites et il nous reste à réaliser l'expérience.

Discussion

- **DciA n'est pas essentielle à la charge de l'hélicase répllicative *in vitro* et *in vivo***

Nos connaissances sur la charge des hélicases répliquatives bactériennes au cours de l'initiation de la réplication du chromosome bactérien concernaient essentiellement deux organismes, *E. coli* et *B. subtilis*. A partir de ces organismes, il a été proposé que les hélicases répliquatives bactériennes dépendent de molécules nommées chargeurs d'hélicases - comme DnaC et DnaI (DnaC/I) - pour être recrutées au niveau du complexe ouvert et chargées sur l'ADN lors de l'initiation de la réplication. Cependant, ce type de chargeurs n'est retrouvé que dans une infime fraction des bactéries (Brézellec *et al.* 2016), suggérant l'existence d'autres chargeurs où a tout le moins, d'autres mécanismes visant à charger les hélicases répliquatives bactériennes sur l'ADN.

Cette hypothèse initiale a conduit à la mise en évidence du gène *dciA* dans les organismes dépourvus des chargeurs DnaC et DnaI (DnaC/I). L'absence systématique de *dciA* dans les cellules spécifiant le chargeur DnaC/I et son implication précoce dans l'initiation de la réplication après la formation du complexe ouvert chez *P. aeruginosa* (Brézellec *et al.* 2016) nous ont conduit à proposer que DciA soit également impliqué dans la charge des hélicases répliquatives. Pourtant, plusieurs éléments nous conduisent à revoir cette hypothèse.

Tout d'abord, et sans qu'il soit possible de corrélérer directement cette observation à la charge de DnaB, la structure des hélicases des organismes à DciA diffère significativement de celle des organismes à DnaC. Nos résultats montrent que l'hexamère de DnaB de *V. cholerae* oscille autour d'une structure légèrement ouverte (Cristallographie et SAXS) (Marsin *et al.* soumis), contrairement à l'hélicase répliquative d'*E. coli* qui se structure en un hexamère strictement fermé (Arias-Palomo *et al.* 2013). Quoique VcDnaB soit ouverte, nous pouvons rejeter l'hypothèse selon laquelle l'hélicase se chargerait sur une molécule d'ADN par cette ouverture, car cette dernière est

trop étroite pour le passage d'une molécule simple brin et son positionnement dans la cavité centrale de l'hélicase.

In vitro, nous montrons par SPR et tests d'activité hélicase que les hélicases à DciA se comportent différemment des hélicases à DnaC ; VcDnaB se charge efficacement sur un substrat ADN simple brin et sépare deux brins appariés sans l'aide de DciA ou tout autre facteur protéique. Dans les mêmes conditions expérimentales, nous confirmons que le chargeur d'hélicase DnaC est indispensable à la charge de l'hélicase réplivative d'*E. coli* (Marsin et al, soumis). Nous montrons de même *in vitro* que les hélicases de *Pseudomonas aeruginosa*, *Azotobacter chroococcum* et *Deinococcus radiodurans*, autres organismes qui possèdent le gène *dciA*, se comportent de la même façon que VcDnaB dans nos conditions expérimentales, confirmant que les organismes à *dciA* chargent leur hélicase réplivative selon un même mécanisme propre mais différent de celui des organismes spécifiant la protéine DnaC.

Nous montrons cependant que DciA stimule significativement la charge de l'hélicase réplivative (facteur 3 d'écart). Cela semble contradictoire avec nos données structurales. La structure cristallographique du complexe VcDnaB:VcDciA révèle que l'anneau d'hélicase est fermé, et donc incapable en l'état de se charger sur l'ADN. Dans ces conditions, et parce que l'hélicase peut se charger de façon autonome sur l'ADN, nous supposons que DciA conforme l'hélicase en une structure permettant la reconnaissance de l'ADN, et que les interactions entre l'ADN et le complexe hélicase stimulent l'ouverture de l'hélicase et sa charge sur l'ADN. Dans ces conditions, la forme fermée de l'hélicase serait la structure compétente pour la charge et l'oscillation de l'hélicase libre entre une forme ouverte et une forme fermée ne pourrait conduire qu'une fraction seulement des hélicases à se charger sur l'ADN. Nous proposons que DciA agisse comme une protéine chaperone en stabilisant une structure fermée de VcDnaB, et que cette structure en présentant une affinité accrue pour l'ADN favorise la charge de l'hélicase sur l'ADN.

D'autres données obtenues *in vivo*, confirment que les hélicases des organismes à DciA peuvent se charger toutes seules sur l'ADN. En considérant que la réplication dépend du recrutement préalable d'une hélicase répllicative, et que celle-ci est essentielle à la processivité du processus de réplication, nous avons analysé la capacité de l'hélicase à se charger sur l'ADN en suivant la synthèse d'ADN après déplétion de DciA. Nous avons montré que la déplétion de DciA ne conduit pas un arrêt de la réplication contrairement à ce qui est observé chez *E. coli* après inactivation du chargeur d'hélicase DnaC ; dans un mutant thermosensible pour le chargeur d'hélicase DnaC (mutant *dnaC2*), les cycles de réplication entamés avant le passage des cellules à température non permissive se finissent mais de nouvelles réplifications ne sont pas initiées, conduisant à l'accumulation de cellules contenant 1 génome. Chez *V. cholerae*, l'analyse par cytométrie de cellules de *V. cholerae* dans lesquelles la protéine DciA est déplétée, montre la production de cellules contenant en apparence un nombre entier de chromosomes. Cependant, lorsque nous bloquons la division cellulaire dans ces cellules pour observer le devenir de l'ADN de ces cellules, nous observons que toutes peuvent encore répliquer leur génome. Cette synthèse d'ADN ne pouvant être indépendante de l'hélicase répllicative, ces résultats suggèrent que l'hélicase VcDnaB s'est chargée sur l'ADN et y est active sans DciA *in vivo*. Une analyse de la fréquence de marqueurs réalisée sur ces mêmes cellules confirme cette conclusion.

- **Fonctions potentielles de DciA**

L'analyse comparée de la fréquence des marqueurs génomiques dans des cellules de *V. cholerae* 7 générations après la délétion de *dciA* et dans des cellules isogéniques sauvages, révèle un profil atypique dans les cellules [*dciA*-]. D'une part, la distribution de la fréquence des marqueurs du réplichore droit (pente de $-2,8 \cdot 10^{-7} \log_2[\text{MF}] \cdot \text{nucl}^{-1}$) est supérieure à celles mesurée sur le réplichore gauche (pente $1,7 \cdot 10^{-7} \log_2[\text{MF}] \cdot \text{nucl}^{-1}$), suggérant un déficit de réplication du réplichore gauche. En accord avec cette hypothèse, nous observons une délocalisation de la région de terminaison de la réplication à 150 kb à l'intérieur du réplichore gauche. D'autre part, *oriC1*

n'est pas le site génomique le plus représenté sur le chromosome I. Au contraire, nous notons l'existence de 2 pics situés de part et d'autre d'*oriC1*. La fréquence des marqueurs correspondant au pic situé dans le réplicore droit est plus importante que dans le réplicore gauche. Quoique très improbable (deux origines dormantes à équidistance de l'origine canonique, vitesses de réplication bidirectionnelles toutes différentes à partir des origines dormantes se traduisant par des pentes différentes) nous ne pouvons pour l'heure complètement exclure la possibilité que ces sites correspondent à 2 origines de réplication cryptiques. En absence de DciA, ces sites seraient activés alors qu'*oriC1* serait réprimé. Nous comptons réaliser une construction dans laquelle la séquence d'*oriC1* sera inversée. Si la réplication du chromosome I est effectivement initiée au niveau de ces 2 origines cryptiques, alors l'inversion d'*oriC1* ne devrait rien changer à la distribution des marqueurs et nous devrions obtenir un profil de MFA identique à celui obtenu pour les cellules YAV201+ara. A l'inverse, si le profil est inversé, et que le pic le plus important est à présent situé dans le réplicore gauche, nous concluons que les 2 pics observés dans les cellules YAV201+ara ne correspondent pas à de l'initiation à des sites cryptiques, mais que leur existence est dépendante d'*oriC1*, et plus précisément une conséquence directe de l'initiation de la réplication à partir d'*oriC1*. Pourquoi dans ces conditions, les marqueurs à proximité de l'origine *oriC1* seraient-ils sous-représentés en absence de DciA ? Etant donné que la fréquence des marqueurs d'*oriC1* reste supérieure à celle de *ter1*, la seule explication possible de ce profil est la dégradation de la région *oriC1*, et plus précisément l'ADN nouvellement synthétisé, dans la foulée de la réplication. Le profil asymétrique au niveau d'*oriC1* nous permet par ailleurs de préciser que cette dégradation touche principalement le réplicore droit et dans une moindre mesure le réplicore gauche.

Après la formation du complexe ouvert, deux hélicases sont chargées à l'origine de réplication sur les 2 brins de la molécule d'ADN. Cette étape initiale conduira à la formation des réplisomes des réplicores droit et gauche, définissant la réplication bidirectionnelle du chromosome. Nous proposons que DciA contribue à cette étape, en assurant une charge

synchrone des deux hélicases à *oriC* en installant directement les 2 hélicases à *oriC*. DciA pourrait améliorer le recrutement des 2 hélicases à *oriC* grâce à son activité chaperone et peut être aussi son homologie structurale avec le domaine N-terminal de DnaA.

Au moment où la réplication est initiée, la fixation ordonnée de DnaA à *oriC* conduit à la formation d'un complexe ouvert ① au niveau duquel sont recrutées 2 hélicases répliquatives (réplication bidirectionnelle) (Figure D1). S'ensuit la formation de 2 réplisomes et la synthèse de l'ADN associée ②. En absence de DciA, la moindre efficacité de recrutement des hélicases conduit fréquemment au recrutement d'une seule hélicase à *oriC* et donc à l'initiation de répliquons unidirectionnels (Figure D1). La fourche au niveau de laquelle l'hélicase n'a pas été chargée est en tout point similaire à une fourche inactivée. Il est donc vraisemblable qu'elle soit traitée comme telle. Dans ces conditions, les profils de MFA observés en absence de DciA pourraient provenir d'un événement initial de réversion de fourche ③ suivi d'une dégradation RecBCD-dépendante de l'ADN ④ jusqu'à ce que la protéine PriA initie la réactivation des fourches ⑤.

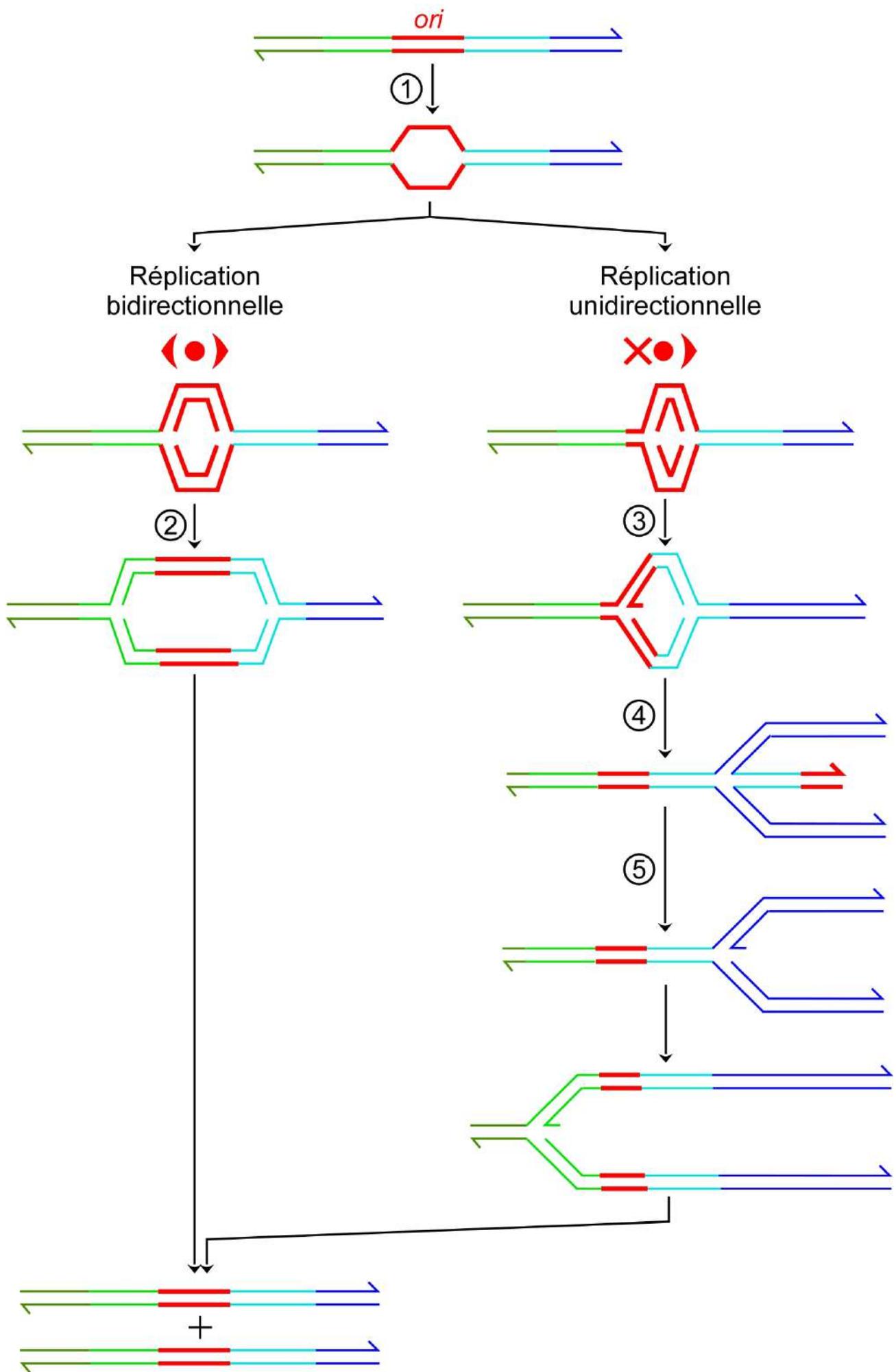


Figure D1. Modèle. Au moment de l'initiation de la réplication, la fixation de la protéine d'initiation sur l'origine de réplication (*ori*) conduit localement à la séparation des 2 brins ①. Dans des conditions sauvages, le recrutement des 2 hélicases conduit à la formation de 2 réplisomes actifs ② à la base d'une réplication bidirectionnelle (côté gauche). Si l'une des fourches de réplication n'est pas activée par défaut de recrutement d'une hélicase répllicative ③, la réplication devient unidirectionnelle (côté droit). Les supertours négatifs qui s'accumulent derrière la fourche de réplication peuvent alors être absorbés au niveau de la fourche qui n'a pas démarrée et conduire à une réversion de fourche ④ et à la formation d'une jonction de Holliday. La résection de cette séquence d'ADN double brin par le complexe RecBCD ou la résolution de la jonction de Holliday ⑤ peuvent conduire à une activation dépendante de PriA de la réplication.

Annexes

Souches

YAV17 (*Vibrio cholerae* E7946); YAV18 (YAV17 Δ *dcIA::dcIAloxP*[*Sp^R*]); YAV20 (YAV18 *LacZ::cre*[*Zeo^R*]); YAV129 (YAV20 *L1::dnaB-c-myc*[*Cm^R*]); YAV201 (YAV129 Δ *dnaB::Kn^R*); YAV380 (YAV17 Δ *dcIA::dcIA-3xFlag*[*Sp^R*] *LacZ::cre*[*Zeo^R*]); YAV420 (*LacZ::cre L1::dnaB-c-myc*[*Cm^R*] Δ *dnaB::Kn^R*); BTH101 (*E. coli* F' *cya-99 araD139 galE15 galk16 rpsL1*[*Str^R*] *hsdR2 mcrA1 mcrB1 relA1*); YAV357 (YAV20/pREP726); YAV360 (YAV20/pREP727)

Plasmides

pEE23 : Le fragment d'amplification #3490-#3491 obtenu par PCR sur pFX465 est digéré HindIII/PmeI et cloné dans le plasmide pEP73 digéré HindIII/PmeI.

pREP673 : les gènes de YAV17, VC2394, V2395 (*dcIA*) et VC2396 ont été amplifiés via les couples d'amorces JLF652-JLF654, JLF655-JLF656 et JLF653-JLF657. Le produit d'amplification JLF652-JLF654 digéré par les enzymes NcoI/XbaI puis cloné dans le plasmide Litmus29 digéré par AvrII/NcoI pour générer pREP699. Les produits d'amplification JLF655-JLF656 et JLF653-JLF657 sont digérés respectivement par BbsI et BbsI/XhoI puis ligués ; le produit résultant est purifié puis cloné dans pREP699 digéré par BbsI/XhoI pour générer pREP672. Un gène de résistance à la spectinomycine est ensuite isolé, digéré XbaI/SacI puis cloné dans pREP672 digéré SacI pour construire pREP673.

pREP702 : Les produits d'amplifications JLF714-JLF716 (VC0370), JLF719-JLF715 (VC0372) obtenus sur YAV17 sont digérés par BsaI et JLF717-JLF718 obtenu sur pACYC177 également, purifiés et ligués. La ligation tri-partite obtenu est ensuite digéré PstI/SacI et cloné dans Litmus 29 digéré de même par PstI/SacI pour donner pREP702.

pREP693 : Les fragments d'amplification #3865-JLF689 (VC0372), #3776-JLF688 (*dnaB*) obtenus sur YAV17 et JLF686-JLF687 obtenu sur pACYC177 ont été digérés SapI/BsaI, BsaI/BsrGI et BsaI respectivement ; purifiés et ligués. Le fragment obtenu digéré NheI/BsaBI et cloné dans le plasmide litmus29 digéré SnaBI/XbaI pour donner le plasmide pREP691. Un fragment contenant la mutation *dnaBS296G* a été isolé du plasmide pAH49 via les amorces #3703-#3704, digéré SfiI/BsrGI puis cloné dans pREP691 digéré BsrGI/SfiI pour générer pREP693.

Plasmides (R74X) : Ces constructions concernent les plasmides portant les 19 mutations testées à la position 74 de *dciA*. Les mutations ont été générées en deux temps ; une partie commune à tous les inserts a été amplifiée via les amorces JLF758-JLF700 sur YAV17 été digérée BsaI/PstI et la seconde amplifiée via JLFX-JLF699 digéré BsaI/EcoRI. JLFX est une amorce dégénérée en position 74. Les produits de digestion sont purifiés, ligués et clonés dans le plasmide pREP712 digéré EcoRI/PstI pour générer les plasmides allant de pREP736 à pREP754. Les amorces JLFX sont : JLF759(Phe), JLF760(Leu), JLF761(Ile), JLF762(Met), JLF763(Val), JLF764(Ser), JLF765(Pro), JLF766(Thr), JLF767(Ala), JLF768(Tyr), JLF769(His), JLF770(Gln), JLF771(Asn), JLF772(Lys), JLF773(Asp), JLF774(Glu), JLF775(Cys), JLF776(Trp), JLF777(Gly).

pREP726 et pREP727 : Le gène de mobilisation *rp4* a été isolé du plasmide pREP712 via les amorces JLF741-JLF742, digéré HindIII/XbaI et cloné dans le plasmide pBAD18 pour générer pREP725. Le gène *dnaC* et l'opéron *dnaCT* isolés à partir de pREP714 via les amorces JLF739-JLF732 et JLF740-JLF732 respectivement sont digérés EcoRI/XbaI puis clonés dans pREP725 pour générer pREP726 et pREP727.

Milieux de culture

Luria-Bertani (Agar 15g/l, bactotryptone 10g/l, yeast extract 5g/l, NaCl 5g/l) ; Minimum-Fructose (KH₂PO₄ 0,3%, Na₂HPO₄ 0,6%, NaCl 0,05%, NH₄Cl 0,1%, MgSO₄ 1mM, CaCl₂ 0,1mM, thiamine 5µg/ml, fructose 0,4%) ; Milieu double hybride (KH₂PO₄ 0,3%, Na₂HPO₄ 0,6%, NaCl 0,05%, NH₄Cl 0,1%, MgSO₄ 1mM, CaCl₂ 0,1mM, thiamine 5µg/ml, X-gal 40µg/ml, IPTG 0,5mM, Agar 15g/l).

Antibiotiques

Spectinomycine (Sp^R) 100µg/ml ; Zeocine (Zeo^R) 25µg/ml ; Chloramphénicol (Cm^R) 3µg/ml ; Kanamycine (Kn^R) 40µg/ml (*V. cholerae*) et 50µg/ml (*E. coli*) ; Streptomycine (Str^R) 100µg/ml.

Anticorps

Anticorps anti-C-myc (Cell Signaling Technology #2276); Conjugué Agarose-Anticorps anti-C-myc (ThermoScientific, Pierce Prod#20168); Anticorps anti-3xFlag (Sigma Aldrich F18040).

Amorces :

Numéro	Séquences (5'-3')
dciA1	ACTGAATTCGTGTGCGGTCATTGGCGACTG
dciA2	CCCGAGGCATAGACTGTACC
#3490	CGTAAAGCTTATGCATAATGTGCCTGTC
#3491	ACGTGTTTAAACCAGGCTTACCCGTCTTACTG
#3703	AAGGAAGCTAGCGGCAGATCCACGTACTGATAATC
#3704	AAGGAAGGTACCTCATCGTCAAATGCAGGTCCAG
#3865	CACGAAATCTTGATATTGTTCAG
#3776	AAGATTGGGCGCGTATCTCTGGCACCATGGGGATTCTCATG
JLF652	TTAATTTCTAGATCATCGACCACAGCAAAG
JLF653	TTAATTCTCGAGGACAACGTACTIONCTGAAAG
JLF654	TTAATTCATGGAAGACTATGCTATACGAAGTTATGCTGGTGTGACGCTATTC
JLF655	TTAATTCATGGAAGACATAGCATACATTATACGAAGTTATCAAAGGAGAATCCGATG
JLF656	TTAATTCCTAGGAAGACATAATGTATGCTATACGAAGTTATACCTGCTCAATCGTCTTTC
JLF657	TTAATTCATGGAAGACTACATTATACGAAGTTATTCTAGAGAGCTCTACACTCACAGAATAGCG
JLF686	AATTAAGGTCTCNCGATTTATTCAACAAAGCCAC
JLF687	AATTAAGGTCTCNTCTTAGAAAACTCATCGAGCATC

JLF688	AATTAAGGTCTCNATCGAAGTTCCTATTCCGAAGTTCCTATTCTCTAGAAAGTATAGGAACTTCTTACTCATCGTCAAATG
JLF689	AATTAAGGTCTCNAAGAAGTTCCTATACTTTCTAGAGAATAGGAACTTCGGAATAGGAACTTCTTCGATGACTATATGAAG
JLF714	AATTAAGTGCAGCTCTAAAACCATCTCATC
JLF715	AATTAAGAGCTCGCGAACGCTCACCTGAC
JLF716	AATTAAGGTCTCAATGACTTCGCTTTAAGTAAC
JLF717	AATTAAGGTCTCATCATGAGCCATATTCAAC
JLF718	AATTAAGGTCTCAAGAAAACTCATCGAGCATC
JLF719	AATTAAGGTCTCATTCTAATTTCGATGAACTATATGAAG
JLF732	TTAATTTCTAGAACTCAAGGTGGAATTGTG
JLF739	TTAATTGAATTCAGAGGTAACGATGAAAAAC
JLF740	TTAATTGAATTCGAGAAACAGTATGTCTTC
JLF741	TTAATTAAGCTTAGATCTGCATTTGCCTGTTCCAGTC
JLF742	TTAATTTCTAGAAGATCTTCTCGTTGGCTTGGTTTC
JLF759	AATTAAGGTCTCCAAAATATGTAAAACTCATAATCGACTTTC
JLF760	AATTAAGGTCTCCAAAATATGTAAACAACCTCATAATCGACTTTC
JLF761	AATTAAGGTCTCCAAAATATGTAAAACTCATAATCGACTTTC
JLF762	AATTAAGGTCTCCAAAATATGTAAACATCTCATAATCGACTTTC
JLF763	AATTAAGGTCTCCAAAATATGTAAACCTCATAATCGACTTTC
JLF764	AATTAAGGTCTCCAAAATATGTAAATGACTCATAATCGACTTTC
JLF765	AATTAAGGTCTCCAAAATATGTAAATGGCTCATAATCGACTTTC
JLF766	AATTAAGGTCTCCAAAATATGTAAATGTCTCATAATCGACTTTC
JLF767	AATTAAGGTCTCCAAAATATGTAAATGCCTCATAATCGACTTTC
JLF768	AATTAAGGTCTCCAAAATATGTAAAGTACTCATAATCGACTTTC
JLF769	AATTAAGGTCTCCAAAATATGTAAAGTGCTCATAATCGACTTTC
JLF770	AATTAAGGTCTCCAAAATATGTAAATGCTCATAATCGACTTTC
JLF771	AATTAAGGTCTCCAAAATATGTAAAGTTCTCATAATCGACTTTC
JLF772	AATTAAGGTCTCCAAAATATGTAAATTTCTCATAATCGACTTTC
JLF773	AATTAAGGTCTCCAAAATATGTAAAGTCTCATAATCGACTTTC
JLF774	AATTAAGGTCTCCAAAATATGTAACTCCTCATAATCGACTTTC
JLF775	AATTAAGGTCTCCAAAATATGTAAAGCACTCATAATCGACTTTC
JLF776	AATTAAGGTCTCCAAAATATGTAAACCACTCATAATCGACTTTC
JLF777	AATTAAGGTCTCCAAAATATGTAAACCCCTCATAATCGACTTTC

Bibliographie.

A

Arai K, Low R, Kobori J, Schlomai J, Kornberg A (1981) Mechanism of dnaB Protein Action. J Biol Chem 256 : 5273-5280

Arias-Palomo EA, O'Shea V, Hood IV, Berger JM (2013) The bacterial DnaC helicase loader is a DnaB ring breaker. Cell 153:438-448

B

Bailey S, Eliason WK, Steitz TA (2007) Structure of Hexameric DnaB helicase and its complex with a domain of DnaG Primase. Science 318:459-463

Bazin A, Cherrier MV, Gutsche I, Timmins J, Terradot L (2015) Structure and primase-mediated activation of bacterial dodecameric replicative helicase. Nucleic Acids Research 43:8564-8576

Berger JM (2008) Snapshot : nucleic acid helicases and translocases. Cell 134: 888

Bleichert F (2019) Mechanisms of replication origin licensing : a structural perspective. Current Opinion in Structural Biology 59 :195-204

C

Campbell JL, Kleckner N (1990) E. coli *oriC* and the *dnaA* gene promoter are sequestered from dam methyltransferase following the passage of the chromosomal replication fork. Cell 62:967-979

Caspi R, Pacek M, Consiglieri G, Helinski DR, Toukadarian A, Konieczny I (2001) A broad host range replicon with different requirements for replication initiation in three bacterial species. EMBO J 20:3262-71

Chovadarapu S, Kaguni J.M (2016) Replication Initiation in Bacteria. Enzymes 39:1-30 ;
Marians KJ (1992) Prokaryotic DNA Replication. Annu. Rev. Biochem. 61:673-719

Colasanti J, Denhart DT (1987) The *Escherichia coli* rep mutation. X. Consequences of increased and decreased Rep protein levels. *Mol Gen Genet* 209 :382-390

Cox MM (2000) Recombinational DNA repair of damaged replication forks in *Escherichia coli*: questions. *Annu Rev Genet* 35:53-82

D

Dalrymple BP, Kongsuwan K, Wijffels G, Dixon NE, Jennigs PA (2001) A universal protein-protein interaction motif in the eubacterial DNA replication and repair system. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98:11627-11632

del Solar G, Giraldo R, Ruiz-Echevaria MJ, Espinosa M, Diaz-Orejas R (1998) Replication and control of circular bacterial plasmids. *Microbiol Mol Biol Rev* 62:434-464

Demarre, G., and Chatteraj, D.K. (2010) DNA adenine methylation is required to replicate both *Vibrio cholerae* chromosomes once per cell cycle. *PLoS Genet* 6:e1000939

E

Egan ES, Waldor MK (2003) Distinct replication requirements for two *Vibrio cholerae* chromosomes. *Cell* 114:521-530

F

Fernandez PC, Frank SR, Wang L, Schroeder M, Liu S, Greene J, Cocito A, Amati B (2003) Genomic targets of the human c-Myc protein. *Genes & Development* 17:1115–1129

Flores MJ, Sanchez N, Michel B (2005) A fork clearing role for UvrD. *Molecular Microbiology* 57(6) :1664-1665

G

Geier G.E, Modrich P (1979) Recognition sequence of the dam methylase of Escherichia coli K-12 and mode of cleavage of DpnI endonuclease. J. Biol. Chem. 254:1408-1413

Grimwade JE, Ryan VT, Leonard AC. (2000) IHF redistributes bound initiator protein, DnaA, on supercoiled oriC of Escherichia coli. Mol Microbiol. 35:835–844

Guy CP, Atkinson J, Gupta MK, Mahdi AA, Gwynn EJ, Rudolph CJ, Moon B, van Knippenberg IC, Cadman CJ, Dillingham MS, Lloyd RG, McGlynn P (2009) Rep provides a second motor at the replisome to promote duplication of protein-bound DNA. Molecular Cell 36 :654-666

H

Hall MC, Matson SW (1999) Helicase motifs : The engine that powers DNA unwinding. Mol. Microbiol. 34:867-877

Hansen FG, Christensen BB, Atlung T (2007) Sequence characteristics required for cooperative and efficient in vivo titration of the replication initiator protein DnaA in E. coli. J. Mol. Biol 367: 942-952

Heidelberg JF, Eisen JA, Nelson WC, Clayton, RA, Gwinn ML, Dodson RJ, *et al.* (2000) DNA sequence of both chromosomes of the cholera pathogen *Vibrio cholerae*. *Nature* 406: 477–483

Heller RC, Marians KJ (2005) Unwinding of the nascent lagging strand by Rep and PriA enables the direct restart of stalled replication forks. J Biol Chem 280 :143-151

Heller RC, Marians KJ (2006) Replisome assembly and the direct restart of stalled replication forks. Nat. Rev. Mol. Cell. Biol. 7:932-943

Honda Y, Akioka T, Takebe S, Tanaka K, Miao D, Higashi A, Nakamura T, Taguchi Y, Sakai H, Komano T (1993) Mutational analysis of the specific priming signal essential for DNA replication of the broad host-range plasmid RSF1010. FEBS Lett. 324:67-70

Hwang D.S, Kornberg A. (1992) Opening of the replication origin of *Escherichia coli* by DnaA protein with protein HU or IHF. *J Biol Chem.* 267:23083–23086

J

Jiang Y, Pacek M, Helinski DR, Konieczny I, Toukadarian A (2003) A multifunctional plasmid-encoded replication initiation protein both recruits and positions an active helicase at the replication origin. *PNAS* 100:8692-8697

Johnson A, O'Donnell M (2005) Cellular DNA Replicases: Components and Dynamics at the Replication Fork. *Annu Rev Biochem* 74:283-315

K

Karimova G, Pidoux J, Ullmann A, Ladant D (1998) A bacterial two-hybrid system based on a reconstituted signal transduction pathway. *Proc Natl Acad Sci* 95 :5752-5756

Katayama T, Kubota T, Kurokawa K, Crooke E, Sekimizu K (1998) The initiator function of DnaA protein is negatively regulated by the sliding clamp of the *E. coli* chromosomal replicase. *Cell* 94:61-71

Kato J, Katayama T (2001) Hda, a novel DnaA-related protein, regulates the replication cycle in *Escherichia coli*. *EMBO J.* 20:4253-4262

Kitagawa R, Mitsuki H, Okazaki T, Ogawa T (1996) A novel DnaA protein-binding site at 94.7 min on the *Escherichia coli* chromosome. *Mol. Microbiol.* 19:1137-1147

Kitagawa R, Ozaki T, Moriya S, Ogawa T (1998) Negative control of replication initiation by a novel chromosomal locus exhibiting exceptional affinity for *Escherichia coli* DnaA protein. *Genes. Dev.* 12:3032-3043

Konieczny I (2003) Strategies for helicase recruitment and loading in bacteria. *EMBO reports* 4:37-41

Kornberg A, Baker T (1992) DNA REPLICATION 2de Edition

Kurokawa K, Nishida S, Emoto A, Sekimizu K, Katayama T (1999) Replication cycle-coordinated change of the adenine nucleotide bound-forms of DnaA protein in *Escherichia coli*. *EMBO J* 18:6642-6652

L

Lane HE, Denhart DT (1975) The *rep* mutation. IV. slower movement of replication forks in *Escherichia coli rep* strains. *J Mol Biol* 97 :99-112

Leonard AC, Grimwade JE (2015) The orisome: structure and function. *Front Microbiol* 6:545

Lestini R et Michel B (2007) UvrD controls the access of recombination proteins to blocked replication forks. *EMBO J* 26 :3804-3814

Lestini R et Michel B (2008) UvrD and UvrD252 counteract RecQ, RecJ and Rec FOR in a *rep* mutant of *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology* 190 : 5995-6001)

Lilly J, Camps M (2015) Mechanisms of theta plasmid replication. *Microbiol Spectrum* 3(1):PLAS-0029-2014

Lindahl T (1993) Instability and decay of the primary structure of DnaA. 362 :709-15

Lo Y-H, Tsai K-L, Chen W-T, Huang C-Y, Hsiao C-D (2009) The crystal structure of a replicative hexameric helicase DnaC and its complex with single-strand DNA. *Nucleic Acids Research* 37 :804-814

Lopez de Saro FJ, Georgescu RE, O'Donnell M (2003) A peptide switch regulates DNA polymerase processivity. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 100:14689-94

Lobner-Olesen A, Skovgaard O, and Marinus MG (2005) Dam methylation: coordinating cellular processes. *Curr Opin Microbiol* 8: 154–160

Lu M, Campbell JL, Boye E, Kleckner N (1994) A negative modulator of replication initiation in *E. coli*. *Cell* 77:413-426

M

Maki H, Kornberg A (1985) The polymerase subunit of DNA polymerase III of *Escherichia coli*. II. Purification of the alpha subunit, devoid of nuclease activities. *J. Biol. Chem.* 260:12987-92

Makowska-Grzyska M, Kaguni J.M (2010) Primase Directs the Release of DnaC from DnaB. *Molecular Cell* 37:90-101

Mann KM, Huang DL, Hooppaw AJ, Logsdon MM, Richardson K, Lee HJ, Kimmey JM, Aldridge BB, Stallings CL (2017) Rv0004 is a new essential member of mycobacterial DNA replication machinery. *Plos Genet* 13(11): e1007115

Masai H, Arai K (1996) DnaA- and PriA-dependant primosomes : two distinct replication complexes for replication of *Escherichia coli* chromosome. *Front Biosci* 1:48-58

Matson SW, Robertson AB (2006) The UvrD helicase and its modulation by the mismatch repair protein MutL. *Nucleic Acids Res* 34 :4089-4097

McGlynn P, Al-Deib AA, Liu J, Marians KJ (1997) The DNA replication protein priA and the recombination protein RecG bind D-Loops. *J. Mol. Biol.* 270:212-221

McGlynn P (2011) Helicases that underpin replication of protein-bound DNA in *Escherichia coli*. *Biochemical Society Transactions* 39:606-610

McMacken R, Ueda K, Kornberg A (1977) Migration of *Escherichia coli* dnaB protein on the template DNA strand as a mechanism in initiating DNA replication. *Proc Natl Acad Sci* 74 :4190-4194

Miao DM, Honda Y, Tanaka K, Higashi A, Nakamura T, Taguchi Y, Sakai H, Komano T, Bagdasarian M (1993) A base-paired hairpin structure essential for the functional

priming signal for DNA replication of the broad host-range plasmid RSF1010. *Nucleic Acids Res* 21:4900-4903

Michel B, Sinha AK, Leach DRF (2018) Replication fork breakage and restart in *Escherichia coli*. *Microbiol Mol Biol Rev* 82:e00013-18

N

Naktinis V, Onrust R, Fang L, O'Donnell M (1995) Assembly of a chromosomal replication machine: two DNA polymerases, a clamp loader, and sliding clamps in one holoenzyme particle. II. Intermediate complex between the clamp loader and its clamp. *J Biol Chem* 270:13358-65

Niedenzu T, Röleke D, Bains Gabrielle, Scherzinger E, Saenger W (2001) Crystal structure of the hexameric replicative helicase. *J Mol Biol* 306:479-487

Nievera C, Torgue JJ, Grimwade JE, Leonard AC (2006) SeqA blocking of DnaA-*oriC* interactions ensures stage assembly of *E. coli* pre-RC. *Mol Cell*. 24:581-592

Nurse P, Liu J, Marians KJ (1999) Two modes of *priA* binding to DNA. *J. Biol. Chem* 274:25026-25032

O

Ogawa T, Yamada Y, Kuroda T, Kishi T, Moriya S (2002) The *datA* locus predominantly contributes to the initiator titration mechanism in the control of replication initiation in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol*. 44:1367-1375

Oka A, Sugimoto K, Takanami MM, Hirota Y (1980) Replication origin of the *Escherichia coli* K-12 chromosome: the size and structure of the minimum DNA segment carrying the information for autonomous replication. *Mol Gen Genet* 178:9-20

Olsen WL, Staudenbauer WL, Hofschneider PH (1972) Replication of bacteriophage M13 : specificity of the *Escherichia coli dnaB* function for replication of double-stranded M13. *DNA Proc Natl Acad Sci* 69 : 2570-73

R

Rasmussen T, Jenssen Bugge R, Skovgaard O (2007) The two chromosomes of *Vibrio cholerae* are initiated at different time points in the cell cycle. *EMBO J* 26:3124-3131

Ruiz-Maso JA, Machon C, Bordanaba-Ruiseco M, Espinosa M, Coll M, del Solar G (2015) Plasmid rolling-circle replication. *Microbiol Spectrum* 3(1):PLAS-0035-2014

S

Saluja D, Godson GN (1995) Biochemical characterization of *Escherichia coli* temperature-sensitive *dnaB* mutants *dnaB8*, *dnaB252*, *dnaB70*, *dnaB43* and *dnaB454*. *J Bacteriol.* 177 :1104-1111

Sandler SJ, Marians KJ, Zavitz KH, Coutu J, Parent MA, Clark AJ (1999) *dnaC* mutations suppress defects in DNA replication and recombination-associated functions in *priB* and *priC* double mutant in *Escherichia coli* K-12. *Mol. Microbiol.* 34:91-101

Sandler SJ (2000) Multiple genetic pathways for restarting DNA replication forks in *Escherichia coli* K-12. *Genetics* 155 :487-497

Sakai H, Komano T (1996) DNA Replication of IncQ Broad-host-range Plasmids in Gram-negative Bacteria. *Biosci Biotech Biochem* 60:377-382

Sherzinger E, Ziegelin G, Barcena M, Carazo JM, Lurz R, Lanka E (1997) The RepA protein of plasmid RSF1010 is a replicative DNA helicase. *J Biol Chem* 272:30228-30236

Singleton MR, Dillingham MS, Wigley DB (2007) Structure and Mechanism of Helicase and Nucleic Acid Translocases. *Annu Rev Biochem* 76:23-50

Skarstad K, Katayama M (2013) Regulating DNA Replication in Bacteria. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 5:a012922

Soni RK, Mehra P, Choudhury NR, Mukhopadhyay G, Kumar Dhar S (2003) Functional characterization of *Helicobacter pylori* DnaB helicase. *Nucleic Acids Research* 31:6828-6840

Soni RK, Mehra P, Mukhopadhyay G, Kumar Dhar S (2005) *Helicobacter pylori* DnaB can bypass *Escherichia coli* DnaC function in-vivo. *Biochem J* 389:541-548

Stewart J, Hingorami MM, Kelman Z, O'Donnell M (2001) Mechanism of beta clamp opening by the delta subunit of *Escherichia coli* DNA polymerase III holoenzyme. *J Biol Chem* 276:82-89

Studwell PS, O'Donnell M (1990) Processive replication is contingent on the exonuclease subunit of DNA polymerase III holoenzyme. *J Biol Chem* 265:71-78

Su'etsugu M, Shimuta TR, Ishida T, Kawakami H, Katayama T (2005). Protein associations in DnaA-ATP hydrolysis mediated by the Hda-replicase clamp complex. *J. Biol. Chem.* 280:6528-6536

Su'etsugu M, Nakamura K, Keyamura K, Kudo Y, Katayama T (2008) Hda monomerisation by ADP binding promotes replicase clamp-mediated DNA-ATP hydrolysis. *J Biol Chem* 283 :36118-36131

Strycharska MS, Arias-Palomo E, Lyubimov AY, Erzberger JP, O'Shea VL, Bustamente PJ, Berger JM (2013) Nucleotide and Partner-Protein Control of Bacterial Replicative Helicase Structure and Function. *Molecular Cell* 52 :844-854

T

Taft-Benz SA, Schaaper RM (2004) The theta subunit of *Escherichia coli* DNA polymerase III: a role in stabilizing the epsilon proofreading subunit. *J. Bacteriol.* 186:2774-80

Ticau S, Friedman LJ, Ivica NA, Gelles J, Bell SP (2015) Single-molecule studies of origin licensing reveal mechanisms ensuring bidirectional helicase loading. *Cell* 161 :513-525

Ticau S, Friedman LJ, Champasa K, Correa IR Jr, Gelles J, Bell SP (2017) Mechanism and timing of Mcm2-7 ring closure during DNA replication origin licensing. *Nat Struct Mol Biol* 24 :309-315

Torheim NK, Skarstad K (1999) Escherichia coli SeqA protein affects DNA topology and inhibits open complex formation at *oriC*. *EMBO J.* 18 :4882-4888

Tsuchihashi Z, Kornberg A (1989) ATP interactions of the tau and gamma subunits of DNA polymerase III holoenzyme of Escherichia coli. *J. Biol. Chem.* 264:17790-95

U

Urbanczyk H, Ast J, Higgins M, Carson J, Dunlap P (2007) Reclassification of *Vibrio fischeri*, *Vibrio logei*, *Vibrio salmonicida* and *Vibrio wodanis* as *Alivibrio fischeri* gen. nov., comb. nov., *Alivibrio logei* comb. nov, *Alivibrio salmonicida* comb. nov and *Alivibrio wodanis* comb. nov. *International Journal of systematic and Evolutionary Microbiology.* 57 : 2823-2829

V

Val ME, Soler-Bistué A, Bland MJ, Mazel D (2014) Management of multipartite genomes: the *Vibrio cholerae* model. *Current Opinion in Microbiology* 22:120-126

Velten M, McGovern S, Marsin S, Ehrlich SD, Noirot P, Polard P (2003) A two-protein strategy for the functional loading of cellular replicative DNA helicase. *Mol Cell* 11 :1009-1020

W

Wang G, Klein MG, Tokonzaba E, Zhang Yi, Haulden LJ, Chen XS (2008) The structure of DnaB-family replicative helicase and its interactions with primase. *Nature structural and Molecular biology* 15 :94-100

X

Xiao H, Naktinis V, O'Donnell M (1995) Assembly of a chromosomal replication machine: two DNA polymerases, a clamp loader, and sliding clamps in one holoenzyme particle. IV. ATP-binding site mutants identify the clamp loader. *J. Biol. Chem.* 270:13378-83

Xong XP, Onrust R, O'Donnell M, Kuriyan J (1992) Three-dimensional structure of the beta subunit of E. coli DNA polymerase III holoenzyme: a sliding DNA clamp. *Cell* 69:425-37

Y

Yuan Z, Riera A, Bai L, Sun J, Nandi S, Spanos C, Chen ZA, Barbon M, Rappsilber J, Stillman B, Speck C, Li H (2017) Structural basis of Mcm2-7 replicative helicase loading by ORC-cdc6 and cdt1. *Nat Struct Mol Biol* 24 :316-324

Titre : Implication de DciA dans l'initiation de la réplication bactérienne. Étude chez *Vibrio cholerae*

Mots clés : Réplication, Hélicase répllicative, Chargeur d'hélicase, DciA.

Résumé : Les hélicases réplcatives sont des enzymes essentielles qui assurent la séparation des deux brins d'ADN pendant la réplication et la processivité de la synthèse de l'ADN. La charge de l'hélicase réplcative est une étape critique de l'initiation de la réplication. Dans les organismes modèles, dans l'étude de la réplication bactérienne (*Escherichia coli* et *Bacillus subtilis*), il a été montré que cette étape est assurée par des facteurs protéiques, nommés « chargeurs d'hélicase ». Cependant, fort peu d'organismes possèdent les gènes spécifiant ces protéines. Une étude phylogénomique a montré que, la très grande majorité des génomes bactériens possèdent à la place un autre gène, ancestral, essentiel, sans lien d'homologie avec les chargeurs d'hélicase et de fonction inconnue à ce jour. Nous avons nommé ce gène *dciA*. Cette étude a également montré que *dciA* a été éliminé à plusieurs reprises au cours de l'évolution et systématiquement remplacé par un gène de chargeur d'hélicase phagique. Ces résultats, suggérant que DciA pourrait être un chargeur d'hélicase, nous a conduit à initier la caractérisation fonctionnelle de DciA.

Une propriété importante distingue catégoriquement les hélicases des organismes possédant DciA de celles des organismes possédant un chargeur d'hélicase.

Les hélicases réplcatives des organismes possédant DciA sont capables de se charger de façon autonome sur l'ADN - c'est-à-dire sans chargeur d'hélicase - *in vitro* et *in vivo*.

En parallèle, nous avons montré que DciA stimulait la charge de l'hélicase réplcative sur l'ADN *in vitro* et que DciA était essentielle et spécifiait une fonction critique pendant l'initiation de la réplication *in vivo*.

Nous montrons par des analyses de cytométrie en flux que le rythme et la synchronie des initiations de la réplication sont affectés par l'absence de DciA. L'analyse de la fréquence de marqueurs génomiques (MFA) dans des cellules *dciA*⁻ confirme que l'initiation de la réplication est altérée et suggère une charge partielle des hélicases à l'origine de réplication. Ainsi, DciA pourrait contribuer à la mise en place d'une réplication bidirectionnelle de l'ADN en aidant à synchroniser la charge des 2 hélicases réplcatives, soit en favorisant l'adoption par l'hélicase d'une conformation compétente pour la charge, soit en assurant la charge coordonnée des 2 hélicases à l'origine de réplication du chromosome. Des résultats génétiques et structuraux à l'appui de cette hypothèse sont présentés.

Title: Implication of DciA in the initiation of bacterial replication. Study in *Vibrio cholerae*

Keywords : Replication, Replicative helicase, Helicase loader, DciA.

Abstract : Replicative helicases ensure DNA unwinding during replication and the processivity of DNA synthesis. The loading of the helicase during replication initiation is critical. In the model organisms (*Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*), this step was shown to depend on designated "helicase loaders". Yet, only a limited amount of species contains the genes encoding these proteins. In a phylogenomic study, it was shown that most bacterial species contain instead an ancestral and essential gene of unknown function. We named this gene, *dciA*. The same study revealed the existence of several bacterial clades in which *dciA* was lost through evolution and systematically replaced by a helicase loader gene of phage origin. These results that suggested that DciA might also be a helicase loader led us to investigate the functional characterization of DciA.

We established that helicases of DciA-type organisms could self-load on DNA *in vitro* and *in vivo*. This property contrasts with the strict requirement for a helicase loader to place the helicase on DNA in organisms encoding a helicase loader and questions the function of DciA. We showed that DciA stimulated the loading of the helicase *in vitro* and that DciA specified an essential and critical function during replication initiation *in vivo*.

We showed by flow cytometry analyses that replication initiation timing and synchrony were perturbed in absence of DciA. Marker frequency analyses (MFA) of *dciA*⁻ cells confirmed the cytological data and suggested that replicative helicases were only partially loaded at the origin of replication of the chromosome. Supporting genetic and structural data are presented.