



HAL
open science

Caractérisation de *cycC*, un nouveau gène impliqué dans le programme de réplication d'*Escherichia coli*

Boubekeur Saïfi

► **To cite this version:**

Boubekeur Saïfi. Caractérisation de *cycC*, un nouveau gène impliqué dans le programme de réplication d'*Escherichia coli*. Sciences agricoles. Université Paris Sud - Paris XI, 2012. Français. NNT : 2012PA112211 . tel-01073566

HAL Id: tel-01073566

<https://theses.hal.science/tel-01073566>

Submitted on 10 Oct 2014

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.

THESE

Présentée pour obtenir le grade de Docteur de l'Université Paris-sud

Ecole doctorale : Gènes, Génome, Cellules

Spécialité : Aspect Cellulaire et Moléculaire de la Biologie

par

Boubekeur SAIFI

Présentée publiquement : 28/09/2012

Caractérisation de *cycC*, un nouveau gène impliqué dans le programme de réplication d'*Escherichia coli*

Membres du jury :

- Rapporteur : M. Pierre BREZELLE, Maître de Conférences UVSQ
- Rapporteur : M. Marc NADAL, Professeur UVSQ
- Président : M. Michael DUBOW, Professeur UPSud
- Examineur : Mme. Bénédicte MICHEL, Directeur de recherche du CNRS
- Examineur : Mme. Kathrin MARHEINEKE, Chargée de recherche, CNRS
- Directeur de Thèse : M. Jean-Luc FERAT, Maître de Conférences UVSQ

Remerciements

En premier lieu, je tiens à exprimer toute ma reconnaissance à Jean-Luc FERAT pour m'avoir permis de réaliser mon rêve, et soutenu tout au long de ces années, surtout pendant les moments difficiles. Merci pour tes conseils, ta disponibilité et pour toutes ces discussions scientifiques qui m'ont tellement apportés. Il est très agréable et enrichissant de travailler à tes côtés.

J'adresse un chaleureux remerciement pour la fondation Dina Surdin et particulièrement à madame Yolande Surdin-Kerjan présidente de la fondation, d'avoir financé mes 4 années de thèse.

Je remercie également François MICHEL, pour m'avoir accueilli dans son équipe, et les membres de l'équipe, Maria COSTA, et Dario MONACHELLO, pour leur soutien d'une façon ou d'une autre.

Je voudrais remercier Pierre BREZELLE, Michael DUBOW, Bénédicte MICHEL, Marc NADAL et Kathrin MARHEINEKE pour l'honneur qu'ils me font de juger ce travail.

C'est l'occasion aussi de remercier le directeur du CGM Frédéric BOCCARD de m'avoir accueilli au sien du CGM, ainsi que toutes les personnes du CGM, qui m'ont soutenues au cours de ces 4 années de thèse, en particulier Bénédicte MICHEL pour ses précieux avis et conseils.

Je tiens aussi à remercier toute ma famille et en particulier, mes parents, mes frères et ma sœur pour leurs encouragements tout au long de ma thèse. Mes pensées vont aussi à tout mes amis.

Sommaire

I) Introduction

I-1) Le cycle cellulaire bactérien.....	6
I-1-1) Coordination du L'initiation de la réplication avec la croissance de la cellule.....	6
I-1-2) La division cellulaire est couplée avec la réplication du chromosome.....	7
I-2) La réplication du chromosome d'<i>Escherichia coli</i>.....	8
I-2-1) Le réplisome.....	9
A) La polymérase.....	9
B) Les facteurs annexes	10
B-1) La protéine SSB.....	10
B-2) L'hélicase (DnaB).....	13
B-3) La primase (DnaG).....	14
I-2-2) Gestion de la topologie de l'ADN au cours du cycle cellulaire.....	15
I-2-3) Ségrégation des deux chromatides sœurs a la fin de la replication.....	17
A) La décaténation de l'ADN.....	17
B) La recombinaison XerCD	17
I-2-4) Redémarrage des fourches de réplication qui sont avortées.....	17
I-2-5) La réponse SOS.....	21
I-3) Initiation de la réplication.....	21
I-3-1) Initiation à <i>oriC</i>	21
A) <i>oriC</i>	21
B) Ouverture de l'origine de réplication d'ADN par DnaA et facteurs annexe.....	23
I-3-2) Initiation de la réplication indépendante d' <i>oriC</i>	25
A) Initiation à <i>oriK</i> (cSDR).....	25
B) Initiation à <i>oriM</i> : induite dans la réponse SOS (iSDR).....	28
I-4) Mode de contrôle de l'initiation de la réplication a <i>oriC</i>	30
I-4-1) Séquestration de l'origine de réplication par SeqA.....	30
I-4-2) Titration de la protéine DnaA sur les sites <i>datA</i>	32

I-4-3) Inactivation de DnaA pendant la réplication (système RIDA).....	33
I-4-4) Mécanisme de contrôle de l'initiation de la réplication chez les autres organismes.....	34
A) Contrôle de l'initiation chez <i>Bacillus subtilis</i>	34
B) Contrôle de l'initiation chez <i>Caulobacter crescentus</i>	34
C) Contrôle de l'initiation chez les Eucaryotes	35
I-4-5) Contrôle d'initiation de la réplication par DnaC.....	38
I-5) Contrôle des initiations de la réplication lorsque les fourches avortent.....	40
I-6) CycC un candidat dans le contrôle du cycle cellulaire	41
II) <u>Résultats</u>	
II-1) Présentation de CycC.....	44
II – 2) CycC et les Topoisomérases de type II.....	46
II-2-1) L'hypersensibilité d'un mutant $\Delta cycC$ résulte du ciblage de Topo IV.....	46
II-2-2) Topo IV est impliquée dans la relaxation de l'ADN devant la fourche de réplication.....	50
II-2-3) L'activité de décaténation de Topo IV n'est pas affectée dans un mutant $\Delta cycC$	53
II-2-4) La topologie de l'ADN n'est pas affectée dans un mutant $\Delta cycC$	56
II-2-5) CycC n'affecte pas la vitesse de réplication.....	58
II -3) CycC et le redémarrage des fourches de replication.....	60
II-3-1) La sensibilité des cellules $\Delta cycC$ à la Novobiocine est contexte génétique- dépendant.....	60
II-3-2) Réactivation des RF dans un mutant <i>dnaC2</i> à température non- permissive.....	62
II-3-3) CycC est nécessaire pour redémarrer les fourches dans un mutant <i>dnaC2</i>	66

II –4) CycC et l’initiation de la réplication.....	68
II-4-1) L’hypersensibilité des cellules $\Delta cycC$ résulte d’un plus grand nombre de collisions des RF dans des adduits ADN :: Topoisomerase.....	68
II-4-2) L’augmentation du nombre de collisions des RF dans les adduits ADN :: Topoisomérase II dans un mutant $\Delta cycC$ n’est pas associée à la surinitiation de la réplication.....	70
II-4-3) CycC affecte un stade précoce de l’initiation de la réplication.....	75
II-4-4) Le complexe ouvert est déstabilisé dans un mutant $\Delta cycC$	125
II-5) CycC et HupA forment une cassette génétique.....	128

III) Discussion et perspectives .

III-1) Discussion.....	132
III-2) Modèle	135
III-3) Perspective	136

IV) Annexes139

V) Références Bibliographique.....142

I) Introduction

I-1) Le cycle cellulaire bactérien

La réplication du génome et la division cellulaire sont les deux étapes du cycle cellulaire. Au moment de la division, le génome doit être dupliqué et les deux copies doivent être physiquement séparées dans la cellule de telle sorte que chacune des deux cellules filles contienne un exemplaire du génome. La réplication du matériel génétique, la ségrégation des deux chromosomes fils et la division cellulaire sont des événements qui doivent être rigoureusement contrôlés et coordonnés les uns par rapport aux autres ; l'ensemble de ces actions participent dans la maintenance de l'ADN qui est partie intégrante du cycle cellulaire. Des connexions existent également entre le cycle cellulaire et le métabolisme puisque la masse des cellules filles naissantes est en moyenne constante.

I-1-1) Coordination de l'initiation de la réplication avec la croissance de la cellule

L'initiation de la réplication du chromosome est coordonnée avec le rythme de croissance cellulaire dans *Escherichia coli* ; le rythme des initiations est une fonction de la « richesse » de l'environnement dans lequel se trouve la cellule (Boye *et al.*, 1996). Chez les eucaryotes, un nombre important de régulateurs du cycle cellulaire et de points de contrôle (*checkpoint*) assurent la régulation de l'initiation de la réplication et de la division, ainsi que la progression de la réplication (Sclafani and Holzen, 2007). Le modèle de la masse à l'initiation développé par Fleming Hansen dans les années 90 est relativement accepté aujourd'hui (Hansen *et al.*, 1991). Ce modèle propose que l'initiation de la réplication de l'ADN est liée à l'accumulation de protéine activées (DnaA~ATP) pendant la croissance de la cellule (Løbner-Olesen, *et al.*, 1989). En d'autres termes, DnaA~ATP s'accumule en quantité suffisante à *oriC* pour tordre la molécule d'ADN et conduire à la séparation des deux brins d'ADN lorsque les cellules atteignent une

taille particulière (masse à l'initiation) (Hansen *et al.*, 1991). Ce modèle propose que le rapport protéine DnaA~ATP/masse de la cellule reste proportionnel au cours de la croissance.

Le potentiel d'initiation représente la quantité de protéine DnaA active ; provenant soit de la synthèse *de novo* de la protéine DnaA soit de la réactivation de la protéine inactivée (DnaA~ADP). Cependant une étude récente a montré que le modèle du potentiel d'initiation à une masse particulière, n'est pas applicable pour tous les organismes (Hill, *et al.*, 2012). Ces données obtenues dans, *Bacillus subtilis*, un organisme dans lequel DnaA, à l'instar de la protéine DnaA de *E.coli*, est un facteur qui définit le rythme de l'initiation de la réplication, indiquent que la réplication peut être initiée à un potentiel plus faible dans un mutant qui a une masse 25% inférieure à celle des cellules sauvage (Hill, *et al.*, 2012).

I-1-2) La division cellulaire est couplée avec la réplication du chromosome

Il existe des mécanismes dans la cellule qui assurent la coordination entre la réplication et la division. Ces mécanismes assurent en particulier que les deux cellules filles reçoivent chacune la moitié du matériel génétique synthétisé au cours de la réplication. Dans *E. coli*, la division cellulaire est initiée par la constriction d'un anneau formé par la polymérisation de la protéine FtsZ au milieu de la cellule (septum) (Rothfield, *et al.*, 1999). Le recrutement de la protéine FtsZ et la polymérisation au milieu de la cellule se fait à la fin de la Réplication (Den Blaauwen *et al.*, 1999). L'oscillation d'un pôle à l'autre de la cellule des protéines MinCDE assure la fixation de FtsZ au milieu de la cellule (Raskin DM and de Boer PA, 1999). La protéine MinD spécifie une activité ATPase et forme un complexe avec MinC, la quelle est ancrée dans la membrane - qui inhibe l'assemblage de FtsZ aux pôles de la cellule (Bi and Lutkenhaus, 1993). La dissociation du complexe MinC-MinD de la membrane est provoquée par MinE qui oscille sous la forme d'un anneau d'un pôle à l'autre de la cellule (Rowland *et al.*, 2000). Ces oscillations régulières génèrent un gradient de concentration du complexe MinDC dans la cellule ; au cours du temps, l'occupation du complexe MinCD aux pôles est maximale, alors qu'au milieu de la cellule – ou la division sera initiée – cette concentration sera minimale (Hu and, Lutkenhaus, 2001)

Pendant la réplication, la protéine SlmA recouvre l'ADN et empêche la polymérisation de l'anneau de FtsZ dans l'espace occupé par la molécule d'ADN (Bernhardt, 2005). Des études récentes ont montré que la protéine SlmA interagit avec des séquences palindromiques de 12pb (séquences répétées 24 fois sur le chromosome d'*E. coli*) et la protéine FtsZ. Cette dernière interaction empêche la polymérisation de FtsZ à un stade tardif de la réplication du chromosomes (Tonthat , 2011., Cho , 2011).

L'organisation spatiale du chromosome d'*E. coli* repose sur l'existence de quatre grandes régions structurées, appelées macrodomaines (ori, ter, left, right), et de deux régions moins structurées (Valens *et al.*, 2004). Les macrodomaines sont des structures d'ADN isolés spatialement les uns des autres dans la cellule. Un travail récent a démontré que la protéine MatP, impliquée dans l'organisation et la ségrégation du macro-domaine Ter, (Mercier, *et al.*, 2008), reconnaît aussi la machinerie de la division cellulaire par l'intermédiaire de ZapB ; cette interaction permet un bon positionnement du Marco-Domaine Ter au milieu de la cellule au moment de la division. L'organisation et la ségrégation du Macro-Domaine Ter est intégrée aussi dans le contrôle du cycle cellulaire (Espeli, *et al.*, 2012).

Les mécanismes impliqués dans la coordination entre les différentes étapes qui constituent le cycle cellulaire restent flous, et notamment lorsque celui-ci est perturbé. En particulier, qu'advient-il du contrôle de l'initiation de la réplication lorsque la réplication est inactivée? Des mécanismes sont-ils spécifiés dans la cellule qui empêchent la collision des nouvelles fourches de réplication dans celles qui n'ont pas encore été réactivées ? Les systèmes de contrôle de l'initiation de la réplication connue à ce jour et impliqués dans un cycle « normal » sont-ils adaptés aux conditions de stress ?

I-2) La réplication du chromosome d'*Escherichia coli*

Dans cette section nous verrons les différentes étapes qui constituent la réplication du chromosome bactérien. Nous nous intéresserons plus particulièrement aux études qui ont été faites dans l'organisme modèle, la bactérie *E. coli*. Nous nous intéresserons à la réplication du chromosome dans des conditions

« normales », c'est-à-dire lorsqu'elle est initiée à l'unique origine du chromosome bactérien, *oriC*, ainsi que dans des conditions particulières de croissances (voir plus bas). De cette revue de littérature, nous essayerons de dégager les contraintes biologiques associées à la réplication de l'ADN ainsi que les systèmes que la cellule a développés au cours de l'évolution pour assurer la processivité de la réplication (régulation de l'initiation, réparation des dommages causés sur l'ADN, progression des fourches de réplication (RF), etc.).

La synthèse du génome circulaire d'*E. coli* est bidirectionnelle. Elle est initiée à *oriC* et se termine au niveau d'une région relativement large (la région *ter*) située à l'opposé d'*oriC*. La réplication dure environ 40 minutes, et ceci quelque soit le milieu de culture (Chandler, *et al.*, 1975). La nature antiparallèle de la double hélice d'ADN implique que l'un des 2 brins de l'hélice est répliqué de façon continue (*leading strand*), tandis que l'autre sera répliqué de façon discontinue (*lagging strand*) tout en maintenant la processivité de la réplication.

I-2-1) Le réplisome

A) La polymérase

E. coli possède cinq ADN polymérases connues (Garcia-Diaz and Bebenek, 2007). L'ADN polymérase III (Pol III) est l'ADN polymérase répllicative qui assure la synthèse du génome (Schekman R, *et al.*, 1974). Les ADN polymérases II, IV et V sont induites pendant la réponse SOS ; elles sont impliquées dans la réparation de l'ADN (Napolitano *et al.*, 2000). L'ADN polymérase I (Pol I) est impliquée dans la synthèse des jonctions des fragments d'Okazaki, ainsi que dans la réparation d'ADN (Savic, *et al.*, 1990).

Chaque Pol III est composée d'un assemblage de 10 protéines comprenant trois éléments essentiels: Le complexe Pol III-core, l'anneau β et enfin le complexe γ qui charge l'anneau β . (figure 1)

1) Le complexe Pol III-core, spécifie l'activité catalytique. Il est composé de la sous-unité α (*dnaE*) qui est impliquée dans la synthèse d'ADN, de la sous-unité ϵ (*dnaQ*), impliquée dans l'activité « *proofreading* » et enfin de la sous-unité θ (*holE*) de fonction inconnue (Reyes-Lamothe, *et al.*, 2010).

2) L'anneau β est un facteur de la processivité (Fang, *et al.*, 2011). Cet anneau est composé du produit du gène *dnaN*. Il est rechargé lors de la synthèse de chaque fragment d'Okazaki (Stukenberg *et al.*, 1994).

3) Le complexe γ est impliqué dans le chargement et le déchargement de l'anneau β (Indiani and O'Donnell, 2003). Ce complexe est composé des sous-unités τ et γ , codées par le gène *dnaX*. Le gène *dnaX* lorsqu'il est transcrit et traduit dans sa totalité conduit à la protéine τ (71kDa). Lors de la traduction de l'ARN messager en protéine, il peut se produire un décalage du cadre de lecture conduisant à un arrêt prématuré de la traduction, et à la synthèse d'une forme tronquée de τ : il s'agit de la sous-unité γ (47,5kDa). (Tsuchihashi and Korenberg, 1990). Le complexe γ , par l'intermédiaire de la sous-unité τ assure un lien physique entre Pol III et l'hélicase répllicative. δ (*holA*) permet l'ouverture de l'anneau β , δ' (*holB*), χ (*holC*) assurent la liaison avec la protéine SSB. Enfin, ψ (*holD*) interagit avec χ et γ et permet l'accrochage de χ à γ (Xiao, *et al.*, 1993).

Des études récentes ont montré que le réplisome contient trois polymérases. L'une de ces 3 unités est associée à la réplication du brin continue (Reyes-Lamothe, *et al.*, 2010). Les deux autres unités s'échangent au cours de la réplication et assurent la synthèse du brin à réplication discontinue (Lia, *et al.*, 2012) (Figure 1).

B) Les facteurs annexes

B-1) La protéine SSB

La réplication du chromosome génère de l'ADN simple brin pendant la réplication discontinue, la protéine SSB (Single Strand DNA Binding) se fixe sur l'ADN simple brin et forme un nucléofilament (Lohman and Ferrari, 1994). Cette fixation a pour conséquence la protection de ce brin de la dégradation ainsi que la non fixation de RecA (Mackay and Linn, 1975). La sous-unité χ interagit avec la protéine

SSB, et du fait de cette interaction avec SSB, elle rentre en compétition avec la primase qui reste fixée (via une interaction avec SSB) à l'extrémité 3'-OH de l'amorce qu'elle vient de synthétiser. Du fait l'interaction entre SSB et χ la primase est déplacée, ce qui libère l'amorce qui pourra ainsi être allongée par PloIII (Yuzhakov *et al.*, 1999).

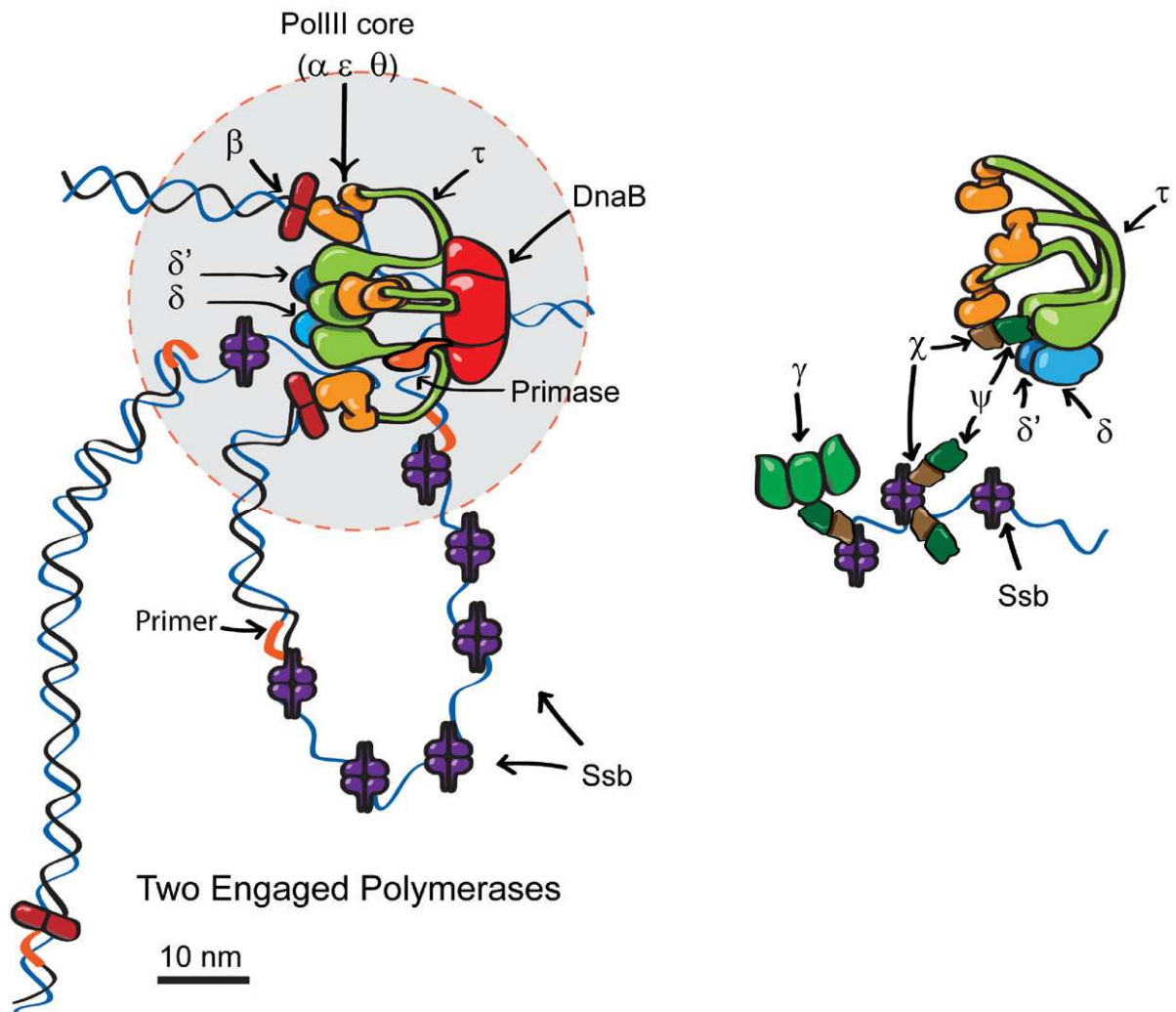


Figure 1 : Schema de la composition du Replisome (Reyes-Lamothe R, *et al.*, 2007)

La sous-unité τ permet la cohésion de la structure de l'holoenzyme en couplant les trois Polymérase, le complexe DnaX et l'hélicase DnaB. τ stabilise l'anneau β associé à la polymérase, ce qui confère une plus grande processivité du système. τ en contactant l'hélicase DnaB stimule son activité, et augmente la vitesse de progression du réplisome. Le recyclage de la polymérase « lagging » est assuré grâce à τ qui en contactant l'ADN au niveau de core PolIII détecte la terminaison d'un fragment d'Okazaki et autorise alors l'ouverture de l'anneau β . Le complexe DnaX permet de fixer et d'ouvrir un anneau β afin de le charger au niveau d'une amorce/matrice. Le ciblage au niveau du brin « lagging » est assuré par χ qui contacte l'ADN couvert de SSB. χ est relié au complexe DnaX par la sous-unité ψ qui interagit avec χ et γ .

B-2) L'helicase (DnaB)

L'ouverture de la molécule l'ADN dans *E. coli* au cours de la réplication est assurée par l'helicase répllicative, DnaB. DnaC est le chargeur dans *E.coli*. Cette protéine assure la constitution de l'hexamère d'helicase autour du brin à réplication discontinue (Wahle , *et al.*, 1989). L'helicase répllicative est chargée sur l'ADN sous la forme d'un complexe DnaB6-DnaC6 mais ne sera active qu'après le décrochage des sous-unités DnaC (Makowska-Grzyska and Kaguni, 2010.). Du fait de la réplication bidirectionnelle de l'ADN chacun des brins à réplication discontinue portera une helicase répllicative (Prescott and Kuempel, 1972). Mellisa L Mott *et al.* propose que l'orientation des complexes DnaBC résulte d'interactions spécifiques de la région amino-terminale de DnaB avec la région amino-terminale de la protéine DnaA, et du domain AAA+ de DnaC avec les domaines III et IV de DnaA (Abe *et al.*, 2007., Mott *et al.*, 2008). Ces interactions assurent la progression des hélicases devant chacune des 2 fourches de réplication (un modèle expliquant le chargement symétrique des hélicases est présenté dans la Figure 2). L'activité hélicase spécifiée par DnaB (de 5' vers 3') est ATP-dépendante (Roychowdhury, *et al.*, 2009), Son activité est rendue processive par son interaction avec la sous unité τ de Pol III et la vitesse d'ouverture de la molécule d'ADN passe de 30 pb/s à 500 bp/s lorsque Pol III et DnaB sont en contact (Kim, *et al.*, 1996)

L'activation de la protéine DnaB se fait au moment de la dissociation de DnaC de DnaB (Skarstad and Wold, 1995). Celle-ci est réalisée lorsque la primase, DnaG, interagit avec la protéine DnaB lors de la synthèse de l'amorce ARN (Makowska-Grzyska and Kaguni, 2010). Cette interaction est importante pour la réplication, car l'interaction de la primase avec DnaB stabilise la conformation en hexamère de l'helicase répllicative et augmente la processivité de l'helicase répllicative (Bailey, *et al.*, 2007)

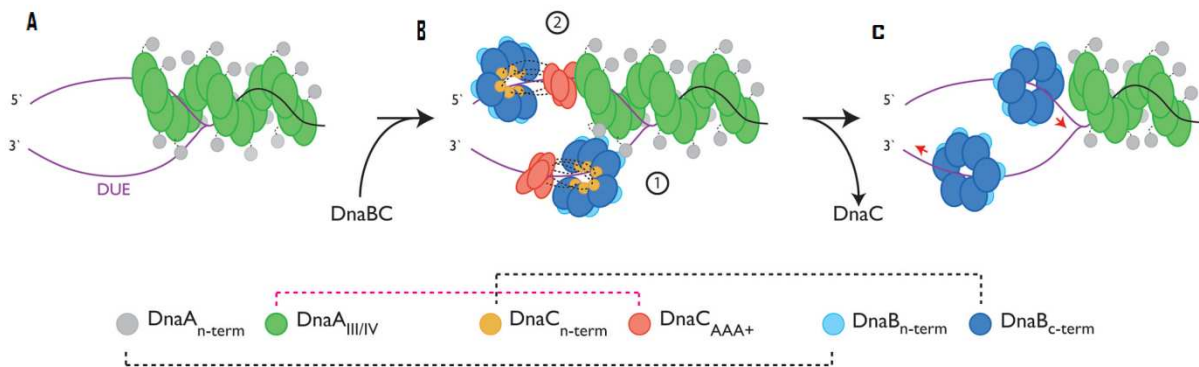


Figure 2 : Modèle du chargement symétrique des hélicase répliquatives à *oriC* (Mott *et al.*, 2008)

A- assemblage de DnaA au niveau d'*oriC* et ouverture de l'ADN au niveau de la région riche en A/T (DUE) (trait violet). B ①- chargement de l'hélicase sur le brin inférieur est facilité par l'interaction directe entre dnaB et DnaA. B ②- DnaC grâce à une interaction directe avec DnaA charge le complexe hélicase répliquative sur le brin supérieur d'*oriC*. C- l'hydrolyse de l'ATP par DnaC libère les deux hexamères dnaB qui migrent dans les sens du mouvement des fourches de réplication.

B-3) La primase (DnaG)

La primase est une ARN polymérase qui synthétise des amorces ARN qui serviront à la synthèse des fragments d'Okazaki. Ces amorces sont synthétisées sur le brin à réplication discontinue environ tous les 1000 paires de bases (Rowen and Korenberg, 1978). La primase est recrutée au niveau du réplisome grâce à son interaction avec l'hélicase répliquative (Tougu and Marians, 1996). Après synthèse de l'amorce, la sous unité χ du réplisome déplace la primase afin de libérer l'amorce pour Pol III (Yuzhakov *et al.*, 1999). La partie ARN des fragments d'Okazaki est ensuite dégradée par la RNase H et remplacée

par de l'ADN synthétisé par l'ADN polymérase I (Pol I). Les fragments sont ensuite joints par la ligase (Montecucco *et al.*, 1988).

I-2-2) Gestion de la topologie de l'ADN au cours du cycle cellulaire

La progression de la fourche de réplication implique l'ouverture de la double hélice d'ADN. De part la nature fermée du chromosome bactérien chaque tour d'hélicase ouvert est converti en un supertour positif devant la fourche de réplication (Figure 3A) ; leur accumulation conduit à la création d'une tension empêche progressivement l'hélicase réplivative DnaB d'ouvrir la molécule d'ADN. La processivité de la réplication réclame que ces supertours positifs soient éliminés à proportion de leur introduction dans l'ADN. Dans les bactéries, la Gyrase - une topoisomérase de type II - est la principale enzyme responsable de leur élimination. La Gyrase est également responsable de l'introduction de supertours négatifs devant la fourche (Gellert, *et al.*, 1976) (figure 3A). Certains de ces supertours positifs peuvent être également éliminés par la rotation de la fourche de réplication sur elle-même (Figure 3A) (Zechiedrich and Cozzarelli, 1995). Ils sont alors convertis en (pré)caténanes positifs en amont de la fourche de réplication. L'accumulation de (pré)caténanes est supposée devenir le mode principal d'élimination des supertours positifs accumulés devant la fourche de réplication à un stade tardif de la réplication du chromosome, du fait de la diminution de l'espace d'ADN accessible par la Gyrase (Zechiedrich and Cozzarelli, 1995) (Figure 3B).

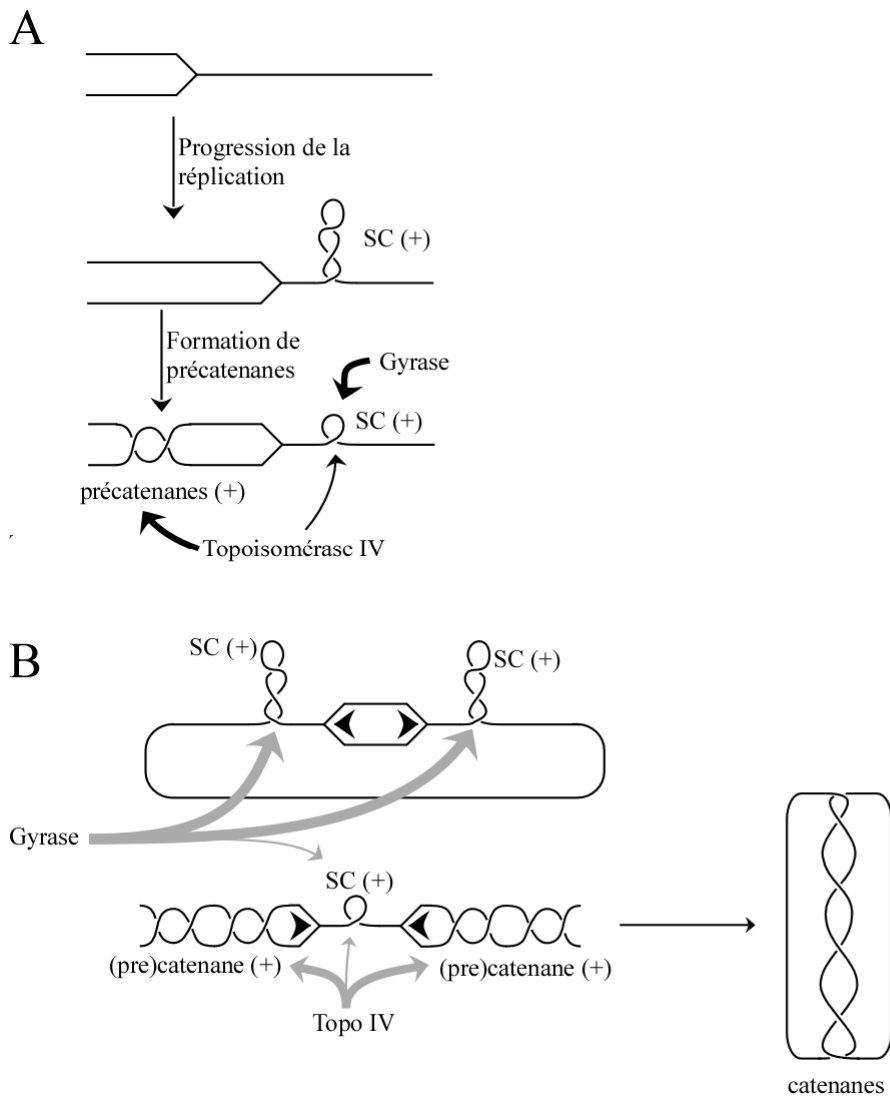


Figure 3 : Fonctions des Topoisomérases de type II pendant la répllication dans *E. coli*.

La progression de la répllication conduit à la formation de supertours positifs en aval de la fourche de répllication (A). La gyrase est principalement responsable de l'élimination de ces supertours, mais Topo IV peut agir secondairement sur ces structures. La disparition d'un supertour positif, par rotation de la fourche de répllication sur elle-même, provoque l'apparition de précaténanes qui représentent le principal substrat de Topo IV (B). En fin de répllication la région d'ADN non répliquée entre les deux fourches est très réduite, empêchant l'action de la gyrase. La polymérase est supposée pivoter sur elle-même intensément à ce moment pour permettre l'achèvement de la répllication, conduisant à l'accumulation d'un nombre important de caténanes.

I I-2-3) Ségrégation des deux chromatides sœurs à la fin de la réplication

A) La décatenation de l'ADN

L'entrelacement des chromosomes nouvellement synthétisés provient de la rotation du réplisome au cours de la réplication (les pré-caténanes). La résolution des caténanes est assurée par la Topoisomerase IV (Topo IV), la deuxième Topoisomérase de type II spécifiée par *E. coli* (Adams *et al.*, 1992; Peng and Marians, 1993). Cette enzyme est un hétérotétramère formé de deux sous-unités (ParC et ParE). Les deux sous-unités ont un profil de localisation qui évolue pendant le cycle cellulaire (Espéli, *et al.*, 2003). Alors que la localisation des deux sous-unités est distincte pendant la plus grande partie du cycle, leur co-localisation est observée en fin de cycle. Cette co-localisation pourrait résulter de l'activation de l'enzyme en fin de la réplication, et plus particulièrement à l'étape de décatenation des chromosomes. Cette conclusion reste débattue, et des résultats présentés dans ce manuscrit indiquent que l'activité de Topo IV n'est pas restreinte à la terminaison de la réplication, mais bien au contraire pendant toute la durée de la réplication.

B) La recombinaison XerCD

Dans un microorganisme à chromosome circulaire, un nombre impair d'événements de recombinaison homologue pendant la réplication conduit à la formation d'un dimère de chromosome (Steiner and Kuempel, 1998). Ce dimère empêche les cellules filles de se diviser car les chromosomes ne peuvent être physiquement séparés dans les cellules filles (Steiner and Kuempel, 1998). La recombinaison des dimères de chromosomes est assurée par deux tyrosines recombinases site spécifique XerC et XerD (Blakely *et al.*, 1993; Barre *et al.*, 2001 et Aussel *et al.*, 2002). La résolution des dimères de chromosomes chez *E. coli* se produit sur un site de recombinaison de 28 pb, *dif*, (*deletion induced filamentation*) situé dans la région terminale du chromosome (Kuempel, *et al.*, 1991).

I-2-4) Redémarrage des fourches de réplication qui sont avortées

La progression des fourches de réplication chez les procaryotes et les eucaryotes est perturbée à par la rencontre d'obstacles divers. La survie de l'organisme devient alors dépendante à la fois de l'élimination de l'obstacle et de la reprise de la réplication. Plusieurs causes peuvent conduire à l'inactivation des fourches de réplifications. La collision d'une fourche de réplication dans une bulle de transcription en est une (De Septenville, *et al.*, 2012). C'est vraisemblablement ce qui explique que le sens des unités de transcription sont majoritairement dans le sens de la réplication. L'arrêt de la réplication peut être provoquée aussi par des coupures d'ADN (Zheng L, *et al.*, 2005), des espaces simple brin dans la molécule d'ADN « gap » (Kuong and Kuzminov, 2010), l'accumulation de supertours positifs devant la fourche de réplication (Michel, *et al.*, 2007). Les mécanismes impliqués dans le redémarrage des fourches ont été essentiellement investigués dans *E. coli*. Les mécanismes de réactivation des fourches sont relativement bien compris.

Différents mécanismes – qui dépendent du type de lésion sur l'ADN - assurent la réactivation des fourches de réplication. Les réversions des fourches qui peuvent résulter d'un avortement des RF, de même que les coupures doubles brin (BSD) sont gérées par le complexe RecBCD et RuvABC. Le complexe RecBCD reconnaît les DSB, se fixe aux extrémités et initie la dégradation des deux brins (Roman, *et al.*, 1991). Lorsque le complexe RecBCD rencontre un site CHI (γ) (Spies, *et al.*, 2003), il perd son activité exonucléase et ne maintien que l'activité hélicase (Spies , *et al.*, 2003). RecA est alors recruté au niveau de l'ADN simple brin généré par le complexe RecBCD (Spies, *et al.*, 2005). L'invasion simple brin induite par RecA entraîne la formation d'intermédiaires de recombinaison à quatre branches (les Jonctions de Holliday (HJ)) (Müller, *et al.*, 1990). Ces HJ peuvent être résolues par le complexe RuvABC ou par RecG (Michel *et al.*, 2007).

Au cours de la réplication, le blocage de la progression de l'ADN polymérase peut conduire Pol III à contourner l'obstacle en sautant littéralement par dessus celui-ci (Yeeles and Marians, 2011). Les trous laissés sur l'ADN mobilisent le complexe protéique RecFOR (Kowalczykowski, 2000). Celui-ci reconnaît

la jonction entre la région simple brin et double brin. La fixation structure-spécifique permet alors de déplacer la protéine SSB de l'ADN, fournissant ainsi à RecA un substrat simple brin d'ADN (Morimatsu and Kowalczykowski, 2003). La formation du nucléofilament de RecA se poursuit à l'intérieur de la région d'ADN encore sous forme double brin et initie le processus de recombinaison et la formation des HJ (Bell, 1999).

L'avortement des fourches de réplication peut conduire à la formation d'une structure, appelée D-loop, dans laquelle les deux brins d'une molécule d'ADN, séparés sur une certaine longueur, sont maintenus écartés par la fixation d'un troisième brin d'ADN (figure 4). Cette structure est reconnue par le produit du gène *priA* (McGlynn *et al.*, 1997). Des études biochimiques ont montré que PriA reconnaît l'extrémité de la fourche et particulièrement l'extrémité 3'-OH du brin à réplication continue, ce qui contribuera à positionner PriA sur le brin à réplication discontinue (Nurse, *et al.*, 1999). PriA en se fixant sur la fourche de réplication change de conformation, et permet le recrutement de PriB qui se fixe à son tour sur l'ADN simple brin libéré par l'activité hélicase de PriA et forme le complexe ternaire PriA : PriB : ADN. Le recrutement de DnaT au niveau de ce complexe nucléoprotéique conduit à la libération de l'ADN simple brin par PriB, créant ainsi un site sur lequel le complexe hélicase répllicative peut être chargé (Lopper, *et al.*, 2007) (Figure 4).

Toutefois, quelques points restent encore incertains comme la fonction de la protéine DnaT dans la formation du primosome de même que le redémarrage PriC-dépendant des fourches de réplication. L'état des fourches inactivées est un deuxième point d'incertitude. Que deviennent les composants du réplisomes après inactivation des fourches ? Les fourches inactivées sont-elles homogènes ?

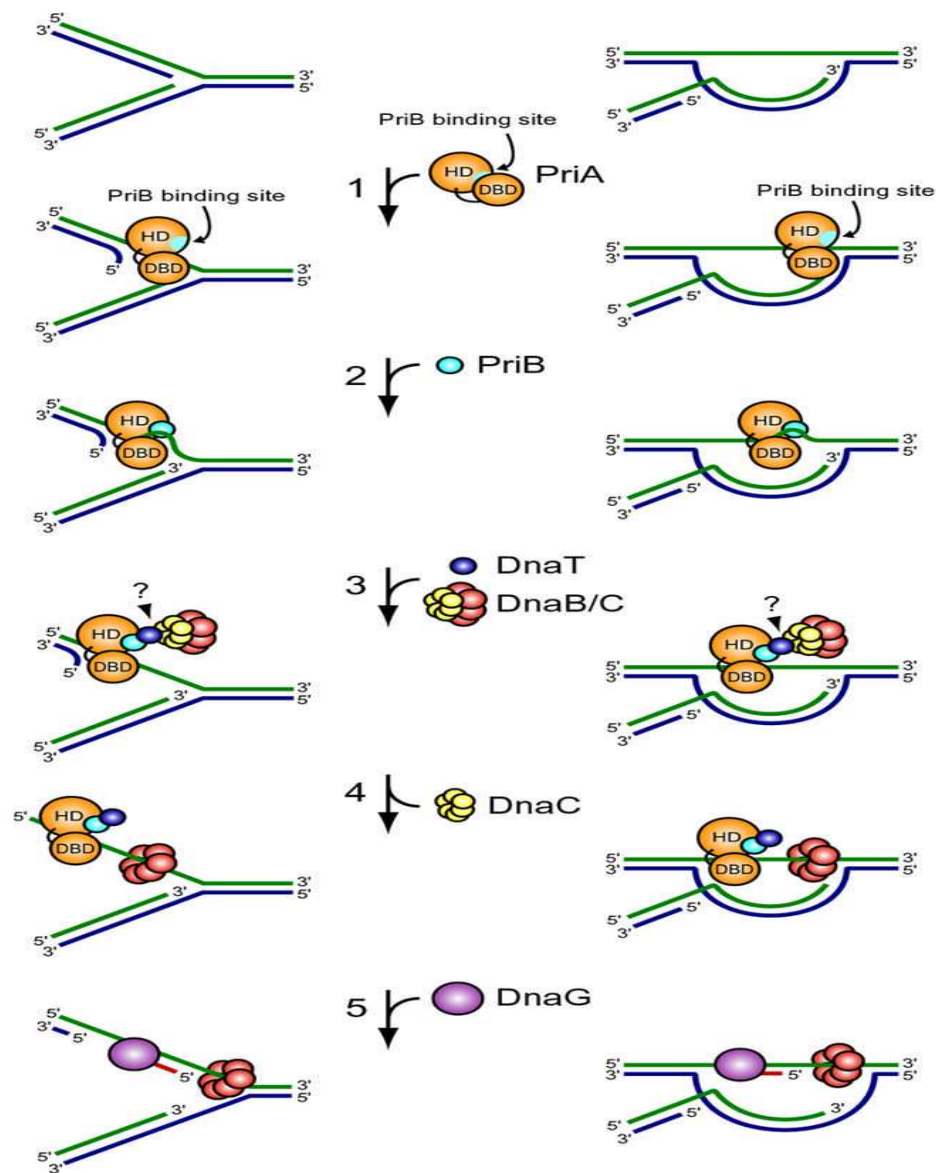


Figure 4 : Modèle d'assemblage du primosome (Lopper M, *et al.*, 2007)

(1) PriA se lie à l'ADN d'une fourche de réplication inactivée ou une D-loop, subit une modification de sa conformation, exposant ainsi le site de liaison de PriB sur le domaine hélicase (HD) de PriA. (2) PriB lie le complexe nucléoprotéine PriA:ADN, en se fixant sur la sous unité HD de PriA via son interaction directe avec le dimère PriB et se liant en même temps avec l'ADN simple brin. L'interaction ternaire PriA: PriB:ADN stabilise PriA sur l'ADN et renforce son activité hélicase, ce qui facilite le déroulement du brin retardé synthétisé, s'il est présent (Cadman *et al.* ; 2005. Ng and Mariens ; 1996a). (3) DnaT est recruté sur le complexe PriA: PriB:ADN et se lie à PriB. Cette interaction provoque la libération de l'ADN simple brin par PriB. Le complexe DnaBC est recruté sur le primosome, potentiellement par une interaction directe avec DnaT. (4) DnaB est chargé à partir du complexe DnaBC sur l'ADN du brin discontinue. (5) Le recrutement de DnaG conduit à la réinstallation du complexe Pol III.

HD : Helicase Domain

DBD : DNA Binding Domain

I-2-5) La réponse SOS

La réponse SOS est induite lorsque de l'ADN simple brin est générée (Janion, 2008). Cette réponse est induite par RecA, la quelle est activée lorsqu'elle est fixée à l'ADN simple brin. Celle-ci conduit à l'auto-protéolyse de LexA qui est le répresseur de la réponse SOS. Le clivage de LexA conduit à la dérépression de l'expression des gènes impliqués dans la réponse SOS. Un des phénotypes associés à l'induction de la réponse SOS est la filamentation des cellules qui résulte de l'expression de SfiA et du blocage de la division cellulaire (Huisman, *et al.*, 1984).

I-3) Initiation de la réplication

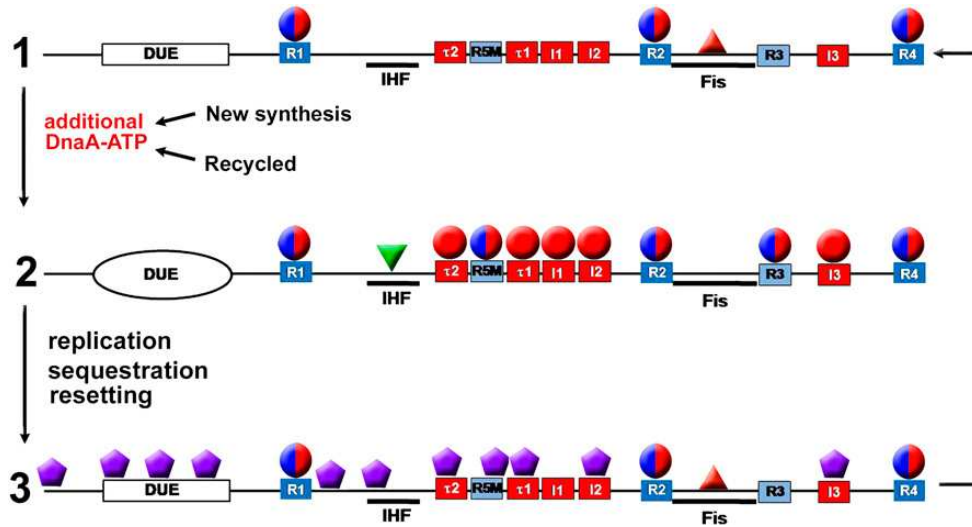
I-3-1) Initiation à *oriC*

A) *oriC*

A l'inverse des cellules eucaryotes qui possèdent plusieurs origines de réplication, la plupart des cellules procaryotes possèdent une seule origine de réplication. Dans *E. coli*, l'initiation de la réplication du chromosome se fait habituellement au niveau d'une séquence spécifique appelé *oriC* (Helmstetter, 1968). La structure de l'origine de réplication est relativement conservée, avec une organisation commune entre les bactéries (la présence de la région riche en A/T et des boites de fixation de la protéine DnaA) (Rajewska *et al.*, 2012).

DnaA induit la formation d'un complexe protéique au niveau d'*oriC* qui assure la séparation des deux brins de la molécule d'ADN. *oriC* contient plusieurs sites de fixation de la protéine DnaA, des séquences appelées: R1, R2, R3, R4 et R5M, et des sites de faible affinité I1, I2, I3, τ_1 et τ_2 . L'ouverture de la molécule d'ADN se fait au niveau de trois sites riches en A/T appelés DUE (DNA Unwinding Element) de 30pb de longueur où se fait le chargement des protéines répliquatives (Duderstadt, *et al.*, 2010) (Figure 5B).

A)



B)

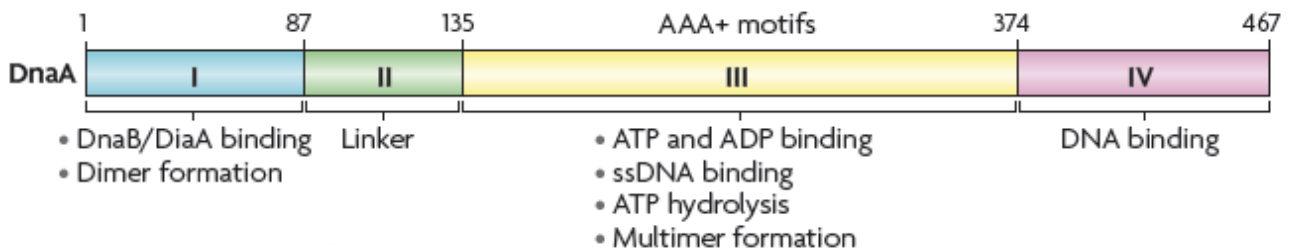


Figure 5 : structure de DnaA et site de fixation au niveau d'oriC

A) Assemblage de nucléoprotéine au niveau d'oriC au cours du cycle cellulaire. (Leonard and Grimwade, 2009) (Etape 1) la protéine DnaA sous la forme DnaA~ADP occupe les sites de forte affinité R1, R2 et R4 au long du cycle cellulaire. La protéine Fis possède un site de fixation entre R2 et R3. (Etape2) Les sites de faible affinité τ_1 , τ_2 , I1, I2, I3 qui fixent préférentiellement DnaA~ATP sont occupés, ainsi que R3 et R5M qui fixe DnaA. la protéine Fis est relarguée d'oriC et la protéine IHF se fixe sur son site entre R1 et R5M. Ceci abouti à la formation du *pre-priming complexe* et l'ouverture de la molécule d'ADN au niveau de DUE (DNA Unwinding Element). (Etape 3) Après le passage de la fourche de réplication, oriC est hemiméthylé, ce qui conduit SeqA a se fixer sur des site GATC hemiméthylés. Cercle rouge DnaA~ATP, Cercle rouge-bleu DnaA~ATP ou DnaA~ADP. Les hexagone violet représentent SeqA, et les triangles rouges et verts représentent Fis et IHF respectivement.

B) les quatre domaines fonctionnels de la protéine DnaA sont représentés. (Katayama T, et al., 2010) Dmaine I : interaction avec les protéines DnaB et DiaA et permet ma formation de dimer. Domaine II : assure la flexibilité de la protéine. Domaine III : Domaine de fixation et d'hydrolyse de l'ATP, de fixation a l'ADN simple brin et de multimérisation. Domaine IV : fixation sur l'ADN.

B) Ouverture de l'origine de replication d'ADN par DnaA et facteurs annexe

Le complexe ouvert est défini comme l'étape qui résulte de l'agrégation de la protéine d'initiation DnaA au niveau d'*oriC* et de l'ouverture de la molécule d'ADN au niveau du DUE. La protéine DnaA fait partie de la famille des AAA+ (ATPase Associated with various cellular Activities) elle possède un domaine de fixation de l'ATP et une activité ATPasique. Elle a une affinité pour l'ADP et l'ATP. C'est toutefois sous la forme DnaA~ATP qu'elle est active (Sekimizu, *et al.*, 1987).

La protéine DnaA est composée de 4 domaines. Le domaine I qui interagit avec l'hélicase DnaB, et participe dans le chargement de cette hélicase au niveau d'*oriC*. Le domaine II qui est le *linker*, permet la flexibilité de la protéine. Le domaine III qui est le domaine ATPasique ainsi que le domaine d'oligomérisation. Enfin le domaine IV qui est le domaine de fixation à l'ADN (figure5)

Dans *E. coli*, 20 à 30 protéines DnaA se fixent spécifiquement sur *oriC* et forment un nucléo-filament (Fuller, *et al.*, 1984). La protéine DnaA~ADP reste fixée sur les boîtes R1, R2 et R4 pendant la quasi totalité du cycle cellulaire (Cassler *et al.*, 1999), et c'est au moment de l'initiation de la réplication qu'il y a une extension de la fixation de la protéine sur les boîtes R3, R5M, I1, I2 I3 τ_1 et τ_2 qui conduit à la formation du complexe ouvert (Leonard and Grimwade, 2005). Cette extension est facilitée par DiaA, une protéine qui forme un tétramère et se fixe sur le domaine I de la protéine DnaA (figure 5A) (Ishida, *et al.*, 2004). Cette interaction favorise la multimerisation de DnaA, et la formation d'une structure reconnue par le complexe hélicase DnaBC pour être chargé sur *oriC* (Keyamura, *et al.*, 2009).

La protéine DnaA est la cible de plusieurs mécanismes qui vont la désactiver, ceci afin d'éviter des initiations prématurées. Afin de lancer un second tour de réplication, la protéine DnaA doit être réactivée au cours de la réplication. La cellule doit avoir acquis un potentiel d'initiation suffisamment fort pour pouvoir ouvrir la molécule d'ADN, ce potentiel est matérialisé par la quantité de protéine DnaA active (DnaA~ATP). Katayama et collaborateurs ont décrit le système DARS (DnaA Reactivating Sequences)

qui permet de réactiver DnaA~ADP en DnaA~ATP ; les deux séquences de 70 pb appelées DARS1 et DRAS2 sont localisées dans des régions inter-géniques entre *bioD-uvrB* (17,49 min.) et *ygpD-mutH* (63,96 min.), respectivement, c'est-à-dire à mi-distance entre *oriC* et *ter*. Les deux séquences sont capables de catalyser l'échange nucléotidique de DnaA~ADP en DnaA~ATP (Fujimitsu *et al.*, 2009). Il est proposé que ce système contribue à augmenter la quantité de protéine DnaA active dans la cellule, afin d'obtenir le potentiel d'initiation nécessaire pour l'ouverture de la molécule d'ADN.

La réactivation de la protéine DnaA~ADP peut se faire également au niveau des membranes. Il a été établi que l'acide phospholipidique (cardiolipine et phosphatidylglycerol) de la membrane peut régénérer la protéine DnaA~ATP en présence de DnaA~ADP (Yung and Kornberg, 1988). Ce modèle propose que le complexe nucléoprotéique *oriC*-DnaA est attaché à la membrane et que le contact entre ce complexe et les phospholipides de la membrane conduit à la réactivation de DnaA~ADP.

L'ouverture de l'origine de réplication nécessite la présence d'autres facteurs qui participent à la synchronisation de l'initiation de la réplication à *oriC*. Les initiations de réplication se font d'une façon synchrone, c'est-à-dire que toutes les origines de réplifications dans la cellule s'allument en même temps (Skarstad, *et al.*, 1986). Les protéines impliquées dans l'initiation de la réplication participent à cette synchronie. La protéine IHF en se fixant sur un site spécifique entre τ_2 et R1 contribue à l'agrégation ordonnée de DnaA sur *oriC* (Polaczek, 1990), alors que la protéine Fis qui se fixe entre les boîtes R2 et R3 tout au long du cycle cellulaire est relarguée au moment de l'initiation de la réplication (Gille, *et al.*, 1991), ce qui permet l'ouverture de la molécule d'ADN (Michael, *et al.*, 1995). Des études ont montré que la délétion de ces deux protéines conduisait à des initiations asynchrones de la réplication (Ryan *et al.*, 2004).

La protéine HupA (protéine impliquée dans l'organisation du chromosome) participe dans la formation du complexe ouvert (Skarstad, *et al.*, 1990). Deog Su Hwang et Arthur Kornberg ont démontré

par un test de sensibilité à la nucléase P1 que l'ajout de HupA, rendait *oriC* plus sensible à la nucléase P1, et donc que l'ouverture de l'élément DUE d'*oriC* par la protéine DnaA est améliorée lorsque HupA est ajoutée lors de la réaction (Hwang and Kornberg, 1992). En accord avec les résultats obtenus à partir d'expériences réalisées *in vitro*, il a été montré que la délétion de *hupA* provoque des initiations asynchrones de la réplication suggérant un rôle de la protéine HupA dans la formation du complexe ouvert dans *E. coli* (Bahloul, *et al.*, 2001).

I-3-2) Initiation de la réplication indépendante d'*oriC*

La réplication peut être initiée à d'autres origines de réplication qu'*oriC* et selon un mécanisme indépendant de la protéine DnaA (Kogoma, 1997). On parle alors de Réplication stable de l'ADN (SDR). Il en existe de deux types : la réplication constitutive et la réplication induite.

A) Initiation à *oriK*. (cSDR)

L'initiation cSDR (constitutive Stable DNA Replication) se produit dans des souches déficientes en activité RNase HI (Kogoma, 1978). La réplication peut être initiée à 5 sites différents appelés *oriK* (De Massy, *et al.*, 1984). Au cours de la transcription, des ARN synthétisés peuvent former un complexe stable avec l'ADN matrice formant ainsi une structure appelée « R-Loop ». La RNase HI dégrade alors spécifiquement la partie ARN de cet hétéro-hybride. Dans un mutant *rnhA*, ces hétéro-hybrides sont stabilisés davantage ce qui leur permet d'amorcer la réplication (Kogoma, 1997). La protéine RecA grâce à son activité échange de brin homologue, pourrait participer dans ce mécanisme (Kogoma, 1997) (figure 6).

Ce système d'initiation de la réplication n'est pas compatible avec un rythme soutenu d'initiation de la réplication ; les souches cSDR ne forment pas de colonie sur milieu riche (Kogoma *et al.*, 1985). Ceci est dû probablement à l'absence d'un système de contrôles adapté à ce mode d'initiation de la réplication

(Von Meyenburg, *et al.*, 1987). Tokio Kogoma a proposé que dans un ancêtre d'*E. coli*, les systèmes DnaA dépendant et DnaA indépendant étaient tous deux fonctionnels. Le gène *rnhA* aurait été acquis secondairement par transfert horizontal (Kogoma, 1997). Par la suite, ce gène aurait été maintenu du fait de l'avantage sélectif qu'il apportait en réprimant efficacement le système de l'initiation de la réplication *oriK*-dépendant, et donc en assurant que la réplication soit initiée exclusivement à *oriC*.

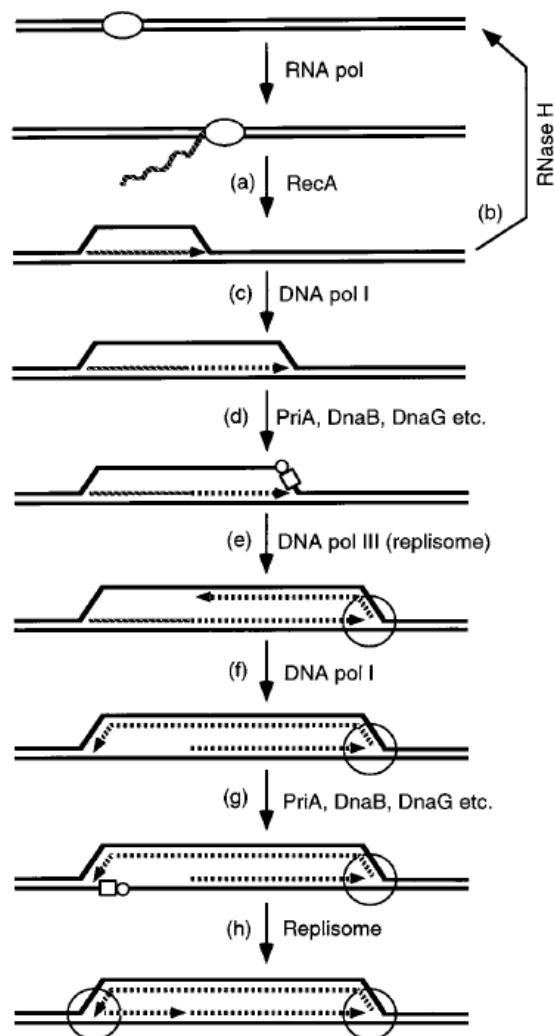


Figure 6: Schéma récapitulatif du processus d'initiation dans les souches cSDR (Kogoma T, 1997). Au cours de la transcription l'ARN synthétisé peut s'hybrider avec son brin complémentaire d'ADN, cette structure est prise en charge par l'enzyme RNAase H qui dégrade cette ARN pour libérer le brin d'ADN. En absence de cette enzyme cette structure est stabiliser, pol I utilise l'extrémité 3' de l'ARN pour amorcer la synthèse d'ADN. PriA initie la formation du primosome, au niveau duquel le chargement de l'helicase réplivative aura lieu. pol I assure l'extension à partir de l'extrémité 3'. DnaB et dnaG sont chargées encore une fois sur l'ADN simple brin pour formé le deuxième réplisome et établir une réplication bidirectionnelle.

B) Initiation à *oriM* : induite dans la réponse SOS (iSDR)

Ce mode d'initiation est dépendant de l'induction préalable de la réponse SOS (Masek and Sedliaková, 1992). Le modèle d'initiation de l'iSDR (inducted Stable DNA Replication) commence par des coupures doubles brin au niveau des sites *oriM1* et *oriM2*, ce qui conduit au recrutement du complexe RecBCD est puis de RecA. Les jonctions de Holliday formées par la suite sont résolues par RuvC (Asai and Kogoma, 1994). La protéine PriA peut alors amorcer le chargement du complexe hélicase répllicative au niveau du brin retardé pour initier la réplication (Kogoma, 1997) (figure7).

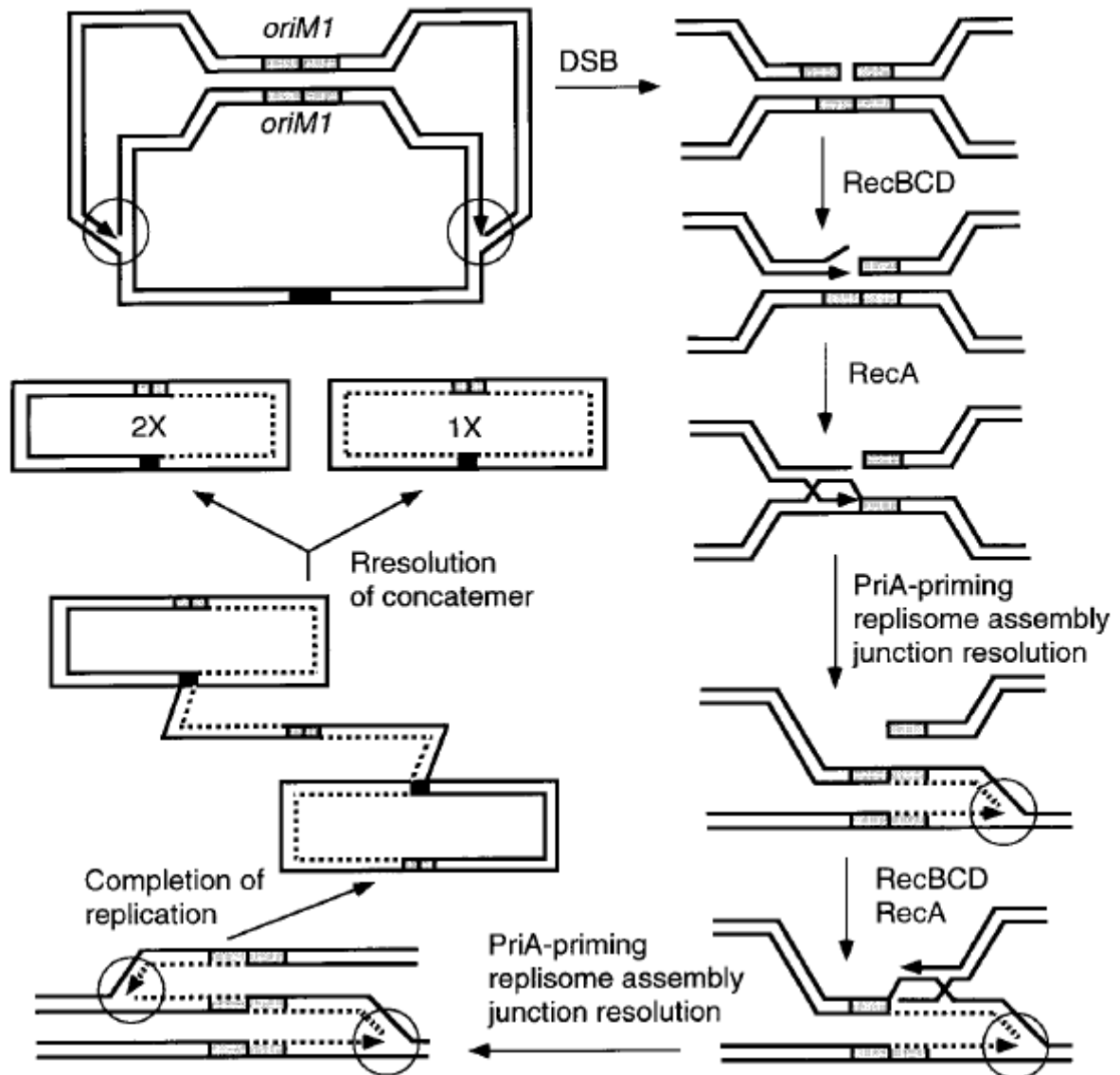


Figure7: modèle de l'initiation iSDR (D loop) (Kogoma T, 1997).

Un chromosome partiellement répliqué possède deux copies d'*oriM1* (cases grises), dont l'un est clivé pour donner une DSB (double Strand Break). La boîte noire indique *Ter*, le site de terminaison de la réplication normale. Les brins d'ADN nouvellement synthétisés et fourches de réplication sont indiquées par des lignes discontinues et des cercles, respectivement. (Voir le texte pour plus de détails).

I-4) Mode de contrôle de l'initiation de la réplication a *oriC*

L'initiation de la réplication est fortement régulée. Dans *E. coli*, trois mécanismes indépendants - tous ciblant la protéine DnaA - assurent que la réplication est initiée une fois et une seule par cycle.

I-4-1) Séquestration de l'origine de réplication par SeqA

La Dam MéthylTransférase (DamMT), codée par le gène *dam*, catalyse le transfert d'un groupement méthyle sur l'adénosine présente dans les séquences GATC (Lobner-Olesen, *et al.*, 2005). C'est une activité post-répllicative. Le temps de vie d'un site GATC hemiméthylé est très court ; dans la minute qui suit leur réplication, ceux-ci sont reméthylés (Campbell and Kleckner, 1990). Deux sites sur le chromosome échappent à une remethylation rapide ; ces sites sont séquestrés (Campbell and Kleckner, 1990). Le premier est *oriC* qui contient 11 sites GATC. Ces sites restent hemiméthylés pendant une période d'environ un tiers du cycle cellulaire (période d'éclipse). Le deuxième site de séquestration correspond à la région promotrice du gène *dnaA* (Campbell and Kleckner, 1990).

La protéine SeqA est responsable de la séquestration d'*oriC* (Lu *et al.*, 1994). Dans un mutant $\Delta seqA$ la réplication est initiée de façon anarchique (Von Freiesleben, *et al.*, 1994). La séquestration de la région promotrice de *dnaA* conduit à la répression de l'expression du gène, immédiatement après initiation de la réplication (Lu *et al.*, 1994). L'analyse des sites de fixation de la protéine SeqA au cours de la séquestration montre que cette dernière bloque la fixation de DnaA à *oriC* au niveau des boîtes DnaA à faible affinité (figure 5) (Leonard and Grimwade, 2009). Cette organisation de SeqA au moment de la séquestration participe aussi à l'agrégation ordonnée de la protéine DnaA au niveau d'*oriC* (Nievera, *et al.*, 2006). Le modèle qui découle de l'étude du profil de fixation de SeqA pendant la réplication du

chromosome suggère un rôle double pour la protéine ; SeqA réprime l'ouverture de la molécule d'ADN tout en assurant la réinitialisation du nouveau tour de réplication (Nievera , *et al.*, 2006)

L'estimation de la surinitiation de la réplication dans un mutant $\Delta seqA$ reste controversée ; en cytométrie eu flux, la quantification de l'initiation de la réplication est mesurée par le traitement des cellules par la Rifampicine et la Cephalexine, qui bloque l'initiation de la réplication et la division cellulaire, respectivement. La surinitiation est alors estimée par la mesure de la quantité d'ADN à l'intérieure de la cellule. Ceci correspond aux nombres de chromosomes et donc aux nombre des initiations produites au cours du cycle cellulaire. Cette estimation est de l'ordre de 3 fois plus importante dans les cellules $\Delta seqA$ par rapport au cellules sauvages (Lu, *et al.*, 1994). Toute fois, l'analyse du rapport *ori/ter* par puce à ADN ou par Southern blot, montre une surinitiation plus modeste de la réplication dans les cellules $\Delta seqA$ (de l'ordre 1,3 plus) (Camara *et al.*, 2005).

SeqA est impliquée dans l'organisation de l'ADN et la ségrégation des chromosomes pendant la réplication (Weitao *et al.*, 1999, 2000). Il a été observé par double hybride que la protéine SeqA interagit avec la sous unité ParC de Topo IV, et que cette interaction stimule l'activité de relaxation et de décaténation de Topo IV ; un mutant $\Delta seqA$ est caractérisé par un défaut de ségrégation et une augmentation de la quantité de supertours négatifs sur l'ADN. Ces phénotypes supportent l'idée que la protéine SeqA est impliquée dans la régulation de l'activité de Topo IV au cours de la réplication (Kang *et al.*, 2003). Afin d'identifier l'impact d'un mutant $\Delta seqA$ exclusivement pendant l'initiation de la réplication à *oriC*, (Bach T and Skarstad K, 2004), les sites GATC d'*oriC* ont été mutés en GTTC, afin de perturber la fixation de la protéine SeqA (Bach and Skarstad , 2004). Cette étude a montré que la disruption des huit sites GATC réduit le temps de séquestration et conduit à de la surinitiation, confirmant ainsi l'implication de SeqA dans le contrôle de l'initiation de la réplication. Cependant, les phénotypes du mutant *oriC* sont moins sévères que ceux associés à un mutant $\Delta seqA$. Les auteurs suggèrent que les phénotypes associés à un mutant $\Delta seqA$ ne sont pas exclusivement attribuables à un défaut dans le

contrôle de l'initiation de la réplication, mais aussi aux autres activités spécifiées par SeqA au cours de la réplication de l'ADN (Bach and Skarstad, 2004).

I-4-2) Titration de la protéine DnaA sur les sites *datA*

Le locus *datA* (DnaA Titration) titre la protéine DnaA (Kitagawa, *et al.*, 1998). Le modèle du contrôle de l'initiation de la réplication par *datA* propose que, lors de la réplication du locus *datA* - situé à 10,6 minute d'*oriC*, cette séquence dupliquée arrive à titrer la protéine DnaA. La quantité de protéine DnaA libre est baissée à un niveau sous-optimal pour initier la réplication. L'implication de *datA* dans le contrôle de l'initiation de la réplication, a été confirmée par une étude indiquant que la délocalisation de cette séquence à un autre site sur le chromosome est critique pour l'initiation ; une duplication tardive de *datA* n'affecte plus l'initiation, sauf lorsque cette séquence est intégrée au niveau du terminus du chromosome (Kitagawa, *et al.*, 1998).

La caractérisation du mutant $\Delta datA$ n'a révélé aucun effet de surinitiation de la réplication (rapport *ori/ter* identique entre *datA*⁺ et $\Delta datA$), à part des initiations asynchrones. Il a été montré que la délétion de la séquence *datA* rendait les cellules résistantes à la Rifampicine, avec un nombre de chromosomes à l'intérieure de la cellule supérieur à celui présent dans les cellules isogéniques sauvages (Morigen, 2005). Les initiations résistantes à la Rifampicine sont observées également dans le mutant Δihf (Von Freiesleben, *et al.*, 2000) et certains mutants *dnaA*^{ts} (*dnaA5*, *dnaA601* et *dnaA606*) (Hansen FG, 1995) ainsi que dans des cellules sauvages cultivées sur milieu pauvre (acétate) (Flåtten *et al.*, 2009). Même s'il paraît très clair que la Rifampicine bloque l'étape de l'initiation de la réplication, le mécanisme de cette inhibition reste à déterminer.

Une étude *in vitro* de l'effet de la Rifampicine sur l'initiation a montré que la protéine DnaA interagit avec l'ARN polymérase (l'enzyme ciblée par la Rifampicine) et que cette interaction confère une résistance de l'ARN polymérase à cette drogue. Il a été proposé que la résistance à la Rifampicine résulte d'un surplus de protéine DnaA au niveau de l'origine de réplication (Flåtten *et al.*, 2009).

La séquence *datA* n'est pas essentielle pour la croissance des cellules ; la délétion de cette séquence n'a aucun effet sur le taux de viabilité, sur la taille ou sur la morphologie des cellules, qu'elles soient cultivées sur milieu riche ou sur milieu pauvre (Kitagawa *et al.*, 1998). Ces observations suggèrent que ce mode de contrôle n'est pas le système principal utilisé par *E. coli* pour contrôler l'initiation de la réplication, mais plus vraisemblablement un outil moléculaire visant à diminuer ponctuellement le potentiel d'initiation.

4-3) Inactivation de DnaA pendant la réplication (système RIDA)

Le troisième mécanisme de contrôle de l'initiation de la réplication consiste en l'inactivation de la protéine DnaA. La molécule d'ATP complexée à DnaA est efficacement hydrolysée en ADP, convertissant la forme active de la protéine d'initiation (DnaA~ATP) en une forme inactive (DnaA~ADP) (Katayama *et al.*, 1998). Dans ce système, l'hydrolyse de la molécule d'ATP est assurée par l'activité phosphatase spécifiée par la protéine DnaA mais qui est stimulée par la protéine Hda (*Homologous DnaA*), elle-même activée pendant la synthèse d'ADN grâce à son interaction avec l'anneau β du replisome (Kato and Katayama, 2001).

RIDA est étroitement lié à la réplication et l'activité de ce système dépend de la progression de la réplication: La question se pose de savoir ce qu'il advient de ce système après avortement des fourches de réplication. La fourche de réplication qui rencontre un obstacle, peut conduire à la dislocation du replisome, et donc à l'inactivation de RIDA. En absence de RIDA, le rythme des initiations de la réplication peut être altéré, ce qui peut conduire à une augmentation du risque de collision des fourches de réplication. Il est primordial pour la cellule de maintenir la période qui sépare les deux fourches de réplication, afin de permettre à celles qui doivent être réactivées de l'être avant le passage d'une nouvelle fourche de réplication. Une étude récente sur la caractérisation du mutant *dnaA^{cos}* a montré que la surinitiation de la réplication observée dans ce mutant résulte de l'inefficacité du système RIDA à inactiver

DnaA. La létalité associée à la culture d'un mutant *dnaA^{cos}* à température non-permissive résulte de la collision des fourches qui initient la réplication les une après les autres (Simmons *et al.*, 2004).

Des trois mécanismes de contrôle de l'initiation de la réplication dans *E. coli* décrits précédemment, le rôle central de RIDA est confirmé par une étude du rapport *ori/ter*, qui montre que ce rapport est plus important dans un mutant Δhda que dans les mutants $\Delta datA$ et $\Delta seqA$ (Camara *et al.*, 2005).

I-4-4) Mécanisme de contrôle de l'initiation de la réplication chez les autres organismes

A) Contrôle de l'initiation chez *Bacillus subtilis*

RIDA est également présent dans *B. subtilis*. Un interactome de *B. subtilis* a montré que YabA interagit à la fois avec DnaA et l'anneau β de Pol III (Noirot-Gros *et al.*, 2006). Cette interaction semble essentielle pour le contrôle du rythme des initiations de la réplication. En effet, la réplication est surinitiée dans un mutant de *dnaA* qui spécifie une protéine incapable d'interagir avec YabA (Cho *et al.*, 2008). A l'appui d'une implication de YabA dans le contrôle de l'initiation de la réplication par le biais d'une interaction avec DnaA et l'anneau β de Pol III, il a été montré aussi que YabA co-localise avec la fourche de réplication pendant la réplication (Goranov *et al.*, 2009). Ces résultats suggèrent que le système spécifié par YabA dans *B. subtilis* est semblable à celui spécifié par Hda dans *E. coli*.

B) Contrôle de l'initiation chez *Caulobacter crescentus*

C. crescentus est une alphaprotéobactérie, cette bactérie se divise de façon asymétrique donnant naissance à une cellule mobile et flagellée et une cellule immobile et pédonculée. Dans le cycle cellulaire de *C. crescentus*, seules les cellules pédonculées sont capables d'initier la réplication du chromosome (Quon *et al.*, 1998). Dans les cellules flagellées la protéine régulatrice de la transcription, CrtA, se fixe sur l'origine de réplication de *C. crescentus* (*Cori*) et inhibe l'initiation de la réplication (Bastedo and Marczyński, 2009). CrtA est une protéine abondante dans les cellules flagellées et sa phosphorylation par CckA améliore la fixation de CrtA au niveau des sites *Cori* (Bastedo and Marczyński, 2009). Au moment

de la différenciation cellulaire – les cellules flagellées deviennent pédonculées - la protéase ClpXP dégrade CrtA, permettant ainsi l'initiation de la réplication (McGrath PT, *et al.*, 2006).

Récemment, il a été montré dans *C. crescentus* que l'activité de DnaA est également régulée grâce à un système similaire à celui spécifiée par Hda dans *E. coli*. HdaA, de *C. crescentus* est un orthologue d'Hda d'*E. coli* (Collier and Shapiro, 2009). Cette protéine réprime les surinitiations dans les cellules pédonculées. Elle co-localise avec l'anneau β pendant la réplication de l'ADN (Collier and Shapiro, 2009), ce qui suggère une inactivation de la protéine DnaA couplée à la progression de la réplication.

Dans *C. crescentus* l'ADN est méthylé au niveau de l'adénosine d'une séquence spécifique GANTC grâce à l'enzyme CcrM (Zweiger *et al.*, 1994). Il a été montré que la surexpression de cette enzyme impacte la morphologie des cellules et conduit à la surinitiation de la réplication (Zweiger *et al.*, 1994).

C) Contrôle de l'initiation chez les Eucaryotes

Le système RIDA est conservé dans le mécanisme de régulation de l'initiation de la réplication chez les eucaryotes. L'inactivation des protéines de l'initiation par l'équivalent de l'anneau beta chez les bactéries (PCNA : *Proliferating Cell Nuclear Antigen* chez les eucaryotes) a été démontré dans les *Schizosaccharomyces pombe*, *Caenorhabditis elegans*, *Xenopus laevis*, et les cellules Humaines (Hu *et al.*, 2004., Arias and Walter ,2006., Kim and Kipreos , 2007., Guarino, *et al.*, 2011). Chez les eucaryotes les protéines Cdt1 et Cdc6 interagissent avec ORC (Origine Recognition Complex, composé de 6 sous-unités) (la fonction du complexe ORC est la même que celle spécifiée par DnaA chez les bactéries) au niveau de l'origine de réplication. Le complexe MCM (Mini Chromosome Maintenance complexe), un hexamère Mcm2-Mcm7, qui sert d'hélicase réplivative au cours de la phase S est recruté au niveau du complexe ORC. La fixation séquentielle de Cdc6 et de Cdt1 active l'hélicase et conduit à l'initiation de la réplication (Bell and Dutta , 2002). Après initiation de la réplication, la protéine Cdt1 est ubiquitiné puis dégradée pour éviter une surinitiation. La cellule a développé deux mécanismes distincts pour inhiber cette protéine. La première stratégie, consiste en la phosphorylation de la protéine Cdt1 par Cdk2, ce qui

conduit à sa reconnaissance par le complexe ubiquitine ligase. L'ubiquitination de Cdt1 est un signal qui conduit à la dégradation de la protéine (Li *et al.*, 2003). Le deuxième système qui dépend de la réplication, consiste en l'interaction entre le clamp (PCNA) et Cdt1, ce complexe est reconnu par un autre complexe qui contient une ubiquitine ligase, et comme le premier mécanisme, l'ubiquitination de Cdt1 conduit à sa dégradation. Prélude à la dégradation de Cdt1 ; l'initiation de la réplication est réprimée (Arias and Walter, 2006). Ainsi, il est proposé que la fonction de PCNA en tant que plate-forme pour la dégradation de Cdt1, assure l'inactivation efficace et temporelle d'un facteur clé du cycle cellulaire (Figure 8).

La fonction d'inhibition de l'initiation de réplication impliquant PCNA chez les eucaryotes ou l'anneau beta des bactéries est très conservée, malgré la diversité des protéines impliquées. Cette fonction est basée sur la reconnaissance d'une activité ADN polymérase comme signal d'une réplication, afin d'inhiber de nouvelles initiations de la réplication. La généralité de ce principe suggère l'importance de ce système de contrôle du cycle cellulaire et conduit à reposer la question de l'impact de l'arrêt de la réplication sur le contrôle de l'initiation de la réplication.

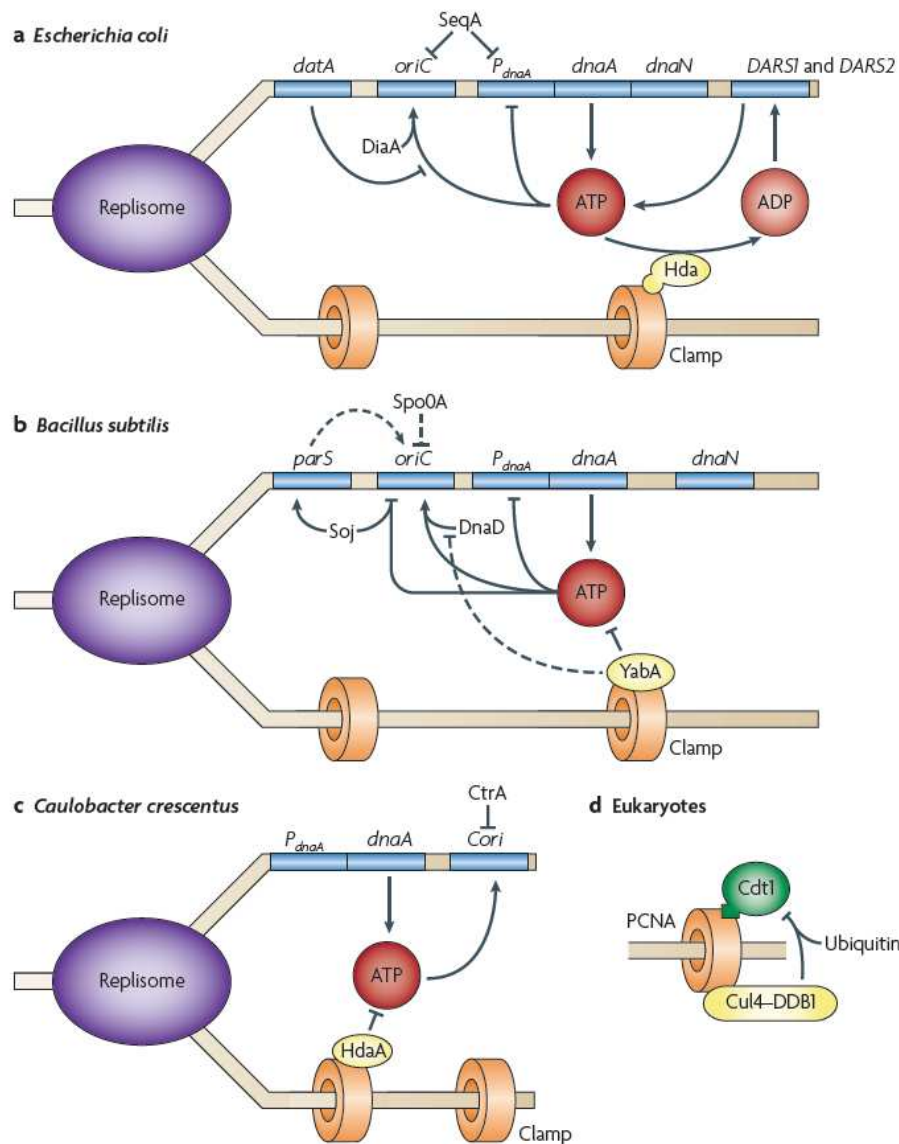


Figure 8 : Les systèmes de contrôle de l'initiation de la réplication chromosomique (Katayama T, *et al.*, 2010).

a, b) Mécanismes chez *Escherichia coli* et *Bacillus subtilis*. La protéine initiateur des bactéries, DnaA, se lie à l'origine de réplication chromosomique (*oriC*) pour déclencher la réplication de l'ADN. DnaA peut être lié à de l'ATP (cercle rouge) ou de l'ADP (cercle rose). Diverses méthodes de contrôle de la concentration de DnaA~ATP et de liaison à *oriC* sont représentés, ainsi que d'autres mécanismes qui agissent au niveau d'*oriC* pour prévenir la réinitiation de la réplication. **c)** Mécanismes chez *Caulobacter crescentus*. Le régulateur transcriptionnel du cycle cellulaire (*CtrA*) se lie à l'origine de réplication de *Caulobacter* (*Cori*) et inhibe l'initiation. DnaA~ATP agit également au niveau de *Cori* pour lancer la réplication et peut être inhibée par HdaA qui est couplé à la réplication par le biais du clamp. **d)** Mécanismes chez les eucaryotes. Après l'initiation, le clamp PCNA chargé sur l'ADN interagit avec Cullin 4 (CUL4)- (DDB1) pour ubiquitylation et dégradation de la protéine initiateur Cdt1

I-4-5) Contrôle d'initiation de la réplication par DnaC

Des études *in vitro* et *in vivo* ont montré qu'une augmentation de la quantité de DnaC bloque l'activité hélicase de DnaB. *In vitro*, Allen et Kornberg ont montré qu'un excès de la protéine DnaC inhibe la réplication, et que l'augmentation de la quantité de DnaC ne bloque pas la formation du « *prepriming complexe* » mais plus tôt l'activation de ce complexe (Allen and Kornberg, 1991). *In vivo*, il a été montré que la surexpression de la protéine DnaC ralentit les fourches de réplication et que cet effet est diminué, lorsque DnaC est co-exprimée avec DnaB ; les auteurs proposent que la protéine DnaC peut interagir avec la fourche de réplication au moment de l'élongation probablement en se fixant sur DnaB. Par conséquent, le ratio de DnaC à DnaB et l'affinité de DnaC pour l'hexamère hélicase au niveau d'une fourche de réplication sont d'une grande importance pour la vitesse des fourches de réplication *in vivo* également. (Skarstad and Wold, 1995).

L'initiation de la réplication est déclenchée lorsque DnaC se dissocie du complexe hélicase répllicative après interaction de DnaG sur DnaB (Makowska-Grzyska and Kaguni J, 2010). Kaguni et collaborateurs proposent que DnaC pourrait être impliquée dans le contrôle de l'initiation de la réplication dans *E. coli*, en inhibant l'activité hélicase de DnaB, en attendant le recrutement de la primase DnaG au niveau de la fourche de réplication (Kaguni, 2011) (Figure 9).

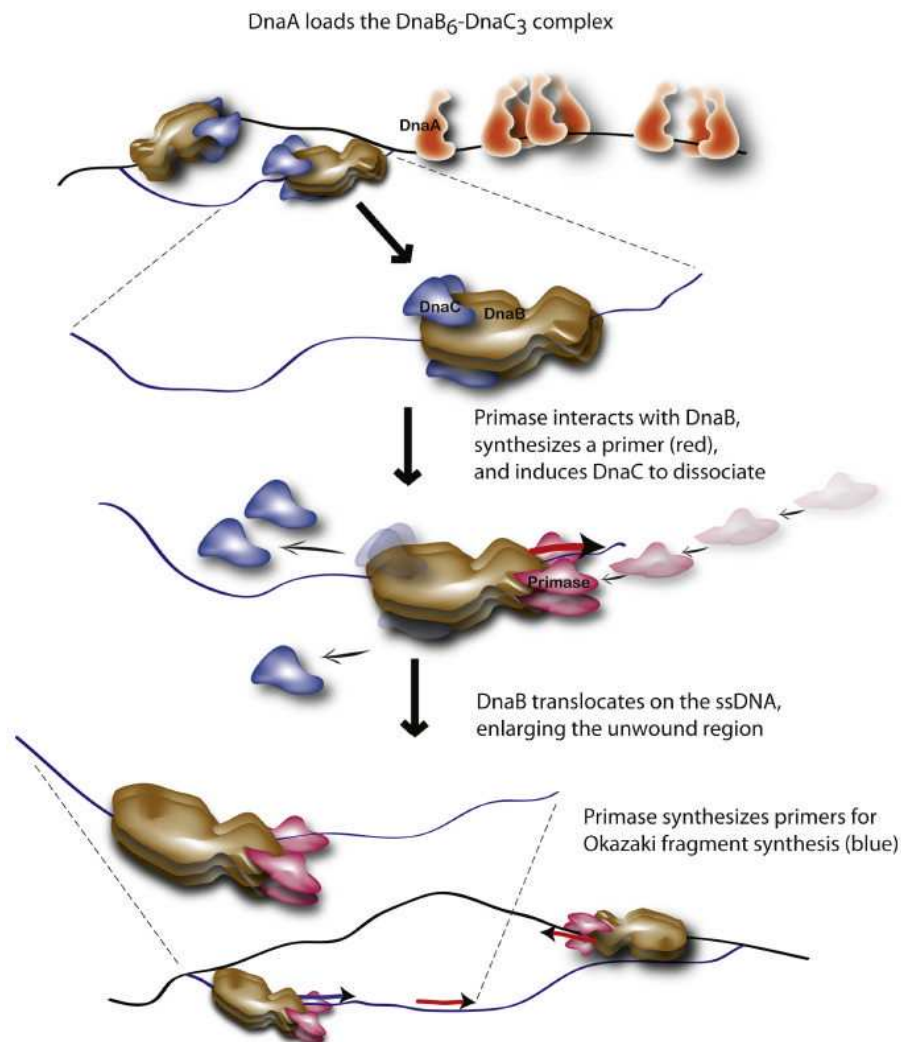


Figure 9: L'interaction de primase avec DnaB définit le passage de l'initiation à la phase d'élongation de la réplication de l'ADN chromosomique chez *E. coli* (Makowska-Grzyska M, *et al.*, 2010). Après chargement du complexe DnaB₆-DnaC₃, le complexe hélicase répliatif est inactif en attente de la libération de DnaC. Ensuite, la primase interagit avec la région C-terminale de DnaB pour induire la dissociation du DnaC. Les auteurs proposent que cette étape est couplée avec la translocation de DnaB sur le brin parental et la synthèse d'amorce. La Primase synthétise ensuite la première amorce (en rouge; la flèches indiquent l'extrémité 3') qui est utilisée pour la synthèse du brin continu par Pol III alors que les amorces suivantes (amorce en bleu) sont utilisés pour la synthèse des fragments Okazaki.

I-5) Contrôle des initiations de la réplication lorsque les fourches avortent

Chez les eucaryotes, l'arrêt de la progression de la fourche de réplication conduit à une cascade de réactions (Heideker *et al.*, 2007) qui assurent la stabilisation des fourches, l'inhibition des initiations tardives de la réplication ainsi que le ralentissement de la progression des fourches qui ne sont pas à l'arrêt (Jones and petermann, 2012). Chez les levures, ce sont les protéines Mec1 et Rad53 qui spécifient cette activité (Segurado and Tercero, 2009). Chez *S. cerevisiae*, la protéine APR se lie à l'ADN simple brin et déclenche le recrutement de Mec1 par l'intermédiaire de sa sous-unité régulatrice Ddc2 au niveau des fourches bloquées (Bonella *et al.*, 2008). Mec1 phosphoryle un médiateur Mrc1 et le signal est transmis à la kinase Rad53, qui est phosphorylée et activée. Rad53, inhibe l'initiation de la réplication des origines retardées, (Segurado and Tercero, 2009).

Après arrêt de la réplication, 1) l'initiation des réplifications tardives est bloquée pour éviter le risque de collision entre les fourches qui se sont arrêtées et celles qui auraient initiées. 2) Les fourches de réplication non arrêtées sont stabilisées. Il a été observé qu'en réponse au MMS (methyl metanosulfonate) un agent qui déstabilise les fourches de réplication, les cellules mutants *rad53* et *mec1* répliquent moins d'ADN que les cellules sauvages. Ce qui suggère que ces mutants accumulent plus de fourches de réplication inactivées de façon irréversible en réponse au MMS. Les auteurs proposent que ces deux protéines assurent la stabilité des fourches de réplifications qui n'ont pas été inactivées en diminuant la vitesse de leurs progressions. (Tercero and Diffley, 2001).

Il a été observé que la synthèse des dNTP au cours de la réplication augmente lorsque l'ADN est endommagé, cette augmentation de dNTP assurerait la réparation des lésions qui sont créées sur l'ADN (Elledge *et al.*, 1993). Une étude a montré que les protéines Mec1 et Rad53 sont impliquées dans le

processus de régulation de la quantité de dNTP dans la cellule, lorsqu'il y a un dommage au niveau de l'ADN. Le modèle propose que lorsqu'il y a une lésion au niveau de l'ADN, la protéine Mec1 active Rad53, de façon à stimuler la dissociation de l'inhibiteur Slm1 de la sous-unité Rnr1 (sous unité de RiboNucleotide Réductase, RNR), Cette cascade de réaction conduit à augmenter la quantité de dNTP dans la cellule (Zhao, *et al.*, 1998).

Ce système joue un rôle important dans la processivité de la réplication lorsque la cellule est exposée à un stress externe. Il serait intéressant de savoir si ce système existe dans les bactéries ?

I-6) CycC un candidat dans le contrôle du cycle cellulaire

Dans *Escherichia coli* la Dam Methyl Transferase (DamMT) est responsable du transfert d'un groupement méthyle sur les adénosines situés au cœur du tétranucléotide GATC (Figure 10) ; il s'agit donc d'une activité post répllicative. Ainsi, après le passage de la fourche de réplication, le brin d'ADN nouvellement synthétisé est non méthylé – l'ADN est dit hémiméthylé. L'ADN reste hémiméthylé pendant une brève période - de l'ordre de la minute - avant d'être reméthylé par la DamMT (Campbell and Kleckner, 1988). L'hypothèse de l'implication de la méthylation de l'ADN dans le contrôle général du programme de maintenance de l'ADN repose essentiellement sur cette observation, puisque l'ADN hémiméthyle – exception faite de l'origine de réplication et de la région promotrice du gène *dnaA* – est diagnostique du passage récent de la fourche de réplication. Cette hypothèse, et le criblage phylogénomique qui en a découlé (Brezellec *et al.*, 2006) a conduit à l'identification de plusieurs gènes dont les produits sont supposés être impliqués dans la maintenance de l'ADN.

yjaG est l'un de ces gènes. Il a été renommé *cycC* en raison des dérèglements de la progression du cycle cellulaire associés à un mutant nul de ce gène (voir résultat). L'étude présentée ici s'attachera à expliquer l'état actuel de nos connaissances sur la protéine CycC et de son implication dans le processus de réplication de l'ADN. Nos résultats montrent que la protéine CycC est impliquée dans la processivité de la réplication lorsqu'il y a un dommage au niveau de l'ADN. CycC spécifie une activité qui conduit à

freiner les fourches de réplication, afin de prévenir des avortements des réplisomes. La surexpression de CycC bloque l'initiation de la réplication entre l'ouverture de la molécule d'ADN et le chargement de l'hélicase répllicative. Nous proposons que CycC interagisse avec le complexe répllicative et ralentit les fourches de réplication. Ce ralentissement prévient de nouvelles collisions lorsque les cellules sont dans des conditions de stress-qui cause des arrêts de la réplication.

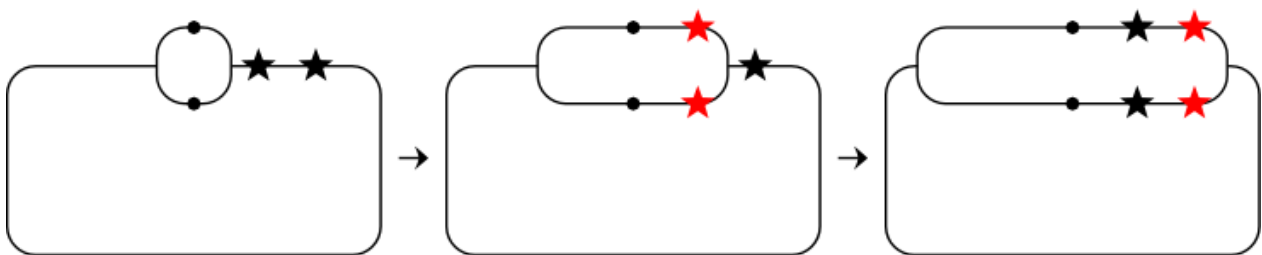
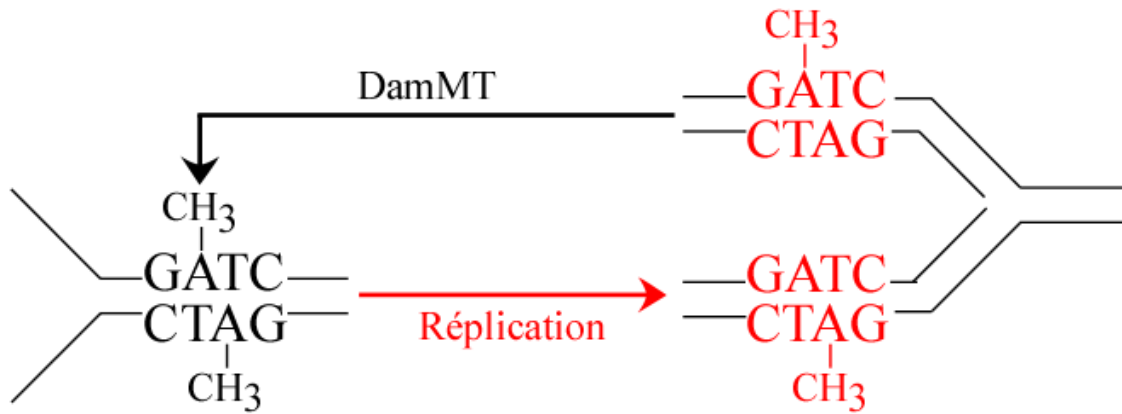


Figure10 : schéma de l'état de la méthylation de l'ADN au cours du cycle cellulaire.

L'ADN est complètement méthylé pendant la plus grande partie du cycle (etoile noir). Après le passage de la fourche de réplication, l'ADN nouvellement répliqué existe transitoirement (environ 1 minute) sous une forme hémiméthylée (etoile rouge) ; la Dam Méthyltransferase assure le transfert d'un groupement méthyle sur l'adénosine des séquences GATC du brin nouvellement synthétisé.

II) Résultats

II-1) Présentation de CycC

Le gène *cycC* spécifie une protéine de 196 acides aminés dont le pI est de 4,5. La structure de la protéine CycC issue de *Shewanella baltica* a été utilisée afin d'identifier la position des acides aminés acides, ainsi que l'orientation de leur chaîne latérale. Ils sont situés de façon homogène sur la surface de la protéine, et les groupements carboxyliques sont tous exposés au solvant, ce qui suggère que CycC n'a pas d'affinité pour les acides nucléiques.

Le gène *cycC* se trouve à quelques minutes de l'origine de réplication du chromosome d'*E. coli* (272 kbp) dans le Macrodomaine *ori* (Valens *et al.*, 2004). L'analyse du positionnement de *cycC* par rapport à *oriC* dans les organismes qui le possèdent révèle que cette proximité, ainsi que la distance par rapport à *oriC* est strictement conservée dans les Entérobactériales et dans les Vibrionales. Dans les Pasteurellales, par contre, cela ne semble pas être le cas (Figure 11A).

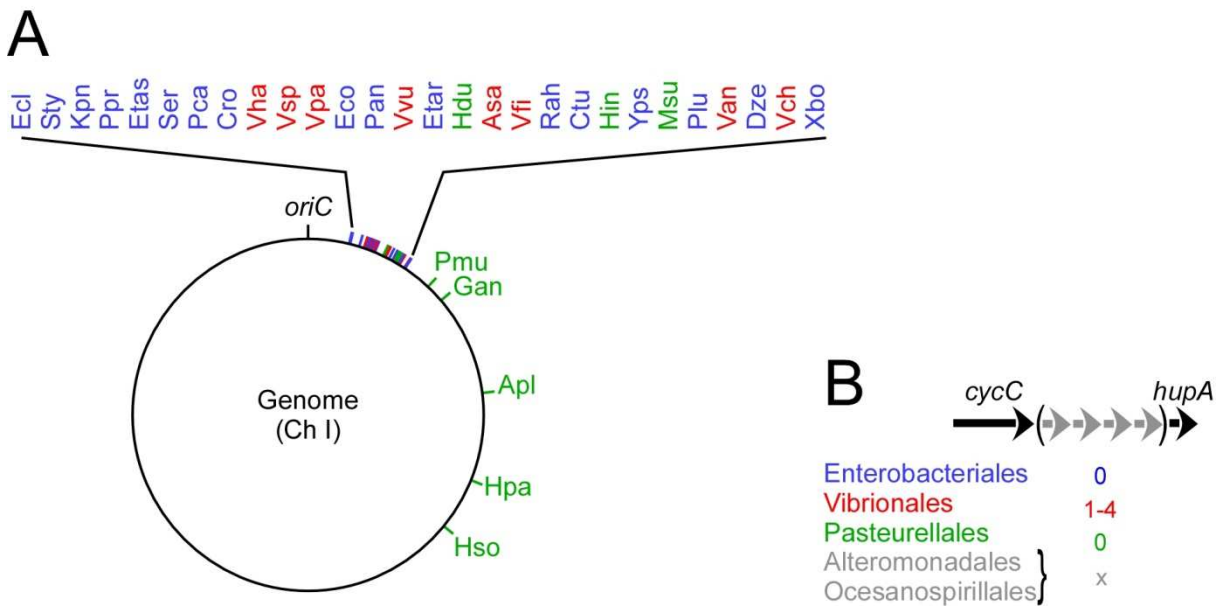


Figure 11 : Localisation de *cycC*. A – *cycC* est situé à proximité de *hupA* dans les Entérobactériales, les Vibrionales et les Pasteurellales. Dans les Vibrionales, quelques orf (entre 1 et 4) peuvent s’intercaler entre les gènes *cycC* et *hupA*. Dans les Océanospirillales et les Altéromonadales, le contexte synténique de *cycC* est très variable. B – La position de *cycC* dans les Entérobactériales (bleu) et les Vibrionales (rouge) est proche de l’origine de réplication du chromosome ($0,065 \pm 0,017$ de la taille du chromosome). Par contre, dans les Pasteurellales, la position n’est pas conservée. *Apl*, *Actinobacillus pleuropneumoniae* L20 ; *Aac*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* D11S-1 ; *Asa*, *Aliivibrio salmonicida* LFI1238 (Ch I) ; *Cro*, *Citrobacter rodentium* ICC168 ; *Ctu*, *Cronobacter turicensis* z3032 ; *Dze*, *Dickeya zeae* Ech1591 ; *Etar*, *Edwardsiella tarda* EIB202 ; *Ecl*, *Enterobacter cloacae* SCF1 ; *Etas*, *Erwinia tasmaniensis* Et1/99 ; *Eco*, *Escherichia coli* K-12 substr. MG1655 ; *Gan*, *Gallibacterium anatis* UMN179 ; *Gag*, *Glaciecocola agarilytica* 4H-3-7+YE-5 ; *Hdu*, *Haemophilus ducreyi* 35000HP ; *Hin*, *Haemophilus influenzae* Rd KW20 ; *Hpa*, *Haemophilus parainfluenzae* ATCC 33392 ; *Hpa*, *Haemophilus parasuis* SH0165 ; *Hso*, *Haemophilus somnus* 2336 ; *Kpn*, *Klebsiella pneumoniae* subsp. pneumoniae MGH 78578 ; *Msu*, *Mannheimia succiniciproducens* MBEL55E ; *Pan*, *Pantoea* sp. At-9b ; *Pmu*, *Pasteurella multocida* subsp. multocida str. Pm70 ; *Pca*, *Pectobacterium carotovorum* subsp. carotovorum PC1 ; *Ppr*, *Photobacterium profundum* SS9 (Ch I) ; *Plu*, *Photobacterium laumondii* TTO1 ; *Rah*, *Rahnella* sp. Y9602 ; *Sen*, *Salmonella enterica* subsp. enterica serovar Typhimurium str. LT2 ; *Ser*, *Serratia* sp. AS12 ; *Van*, *Vibrio anguillarum* 775 (Ch I) ; *Vch*, *Vibrio cholerae* O1 biovar El Tor str. N16961 (Ch I) ; *Vfi*, *Vibrio fischeri* ES114 (Ch I) ; *Vha*, *Vibrio harveyi* ATCC BAA-1116 (Ch I) ; *Vpa*, *Vibrio parahaemolyticus* RIMD 2210633 (Ch I) ; *Vsp*, *Vibrio splendidus* LGP32 (Ch I) ; *Vvu*, *Vibrio vulnificus* CMCP6 (Ch I) ; *Xbo*, *Xenorhabdus bovienii* SS-2004 ; *Yps*, *Yersinia pseudotuberculosis* IP 31758.

II – 2) CycC et les Topoisomérases de type II

L'implication de CycC dans la maintenance de l'ADN remonte à une analyse préliminaire menée sur les gènes *dam*^{rdt}. Lors de cette étude, l'implication du produit des gènes *dam*^{rdt} dans différentes fonctions impliquant la reconnaissance de l'état de méthylation de l'ADN avait été testée, comme la réparation des mésappariements, a été vérifiée en mesurant le taux d'acquisition de mutations spontanées conférant la résistance à la Rifampicine et à l'Acide Nalidixique (Chopra I *et al.*, 2003). Les résultats obtenus étaient surprenants et inexplicables ; alors qu'un mutant $\Delta cycC$ acquiert la résistance à la Rifampicine à une fréquence identique à celle d'une souche isogénique sauvage, une souche $\Delta cycC$ semblait incapable d'acquérir la résistance à l'Acide Nalidixique. Puisque les mutations qui confèrent la résistance à l'acide Nalidixique s'accumulent principalement dans le gène *gyrA* – le gène spécifiant la sous-unité non catalytique de la Gyrase – il était possible d'interpréter l'absence de clone $\Delta cycC$ résistant à l'Acide Nalidixique comme la conséquence d'une incompatibilité entre la perte de *cycC* et une altération de la Gyrase, l'enzyme la plus sensible aux quinolones (Khodursky and Kozzarelli, 1998).

II-2-1) L'hypersensibilité d'un mutant $\Delta cycC$ résulte du ciblage de Topo IV

La mutation $\Delta cycC$ n'est pas incompatible avec l'acquisition d'une mutation conférant la résistance aux quinolones ; nous avons pu transférer efficacement une mutation conférant la résistance aux quinolones (*gyrA*^{L83}) dans un mutant $\Delta cycC$. Nous avons alors comparé la sensibilité à la Norfloxacin des cellules *gyrA*^{L83} $\Delta cycC$ à celle des cellules *gyrA*^{L83}*cycC*⁺ et établi que les cellules *gyrA*^{L83} $\Delta cycC$ sont plus sensibles aux quinolones que les cellules isogéniques *cycC*⁺ (figure 12).

Nous avons continué l'investigation afin de déterminer 1) si l'activité de l'une, de l'autre ou des deux Topoisomérases est affectée dans un mutant $\Delta cycC$ et 2) quelle(s) activité(s) de cette/ces enzyme(s) est/sont ciblée(s).

Nous avons introduit un allèle $parC^{K84}$ et créé une souche spécifiant une Gyrase et une Topo IV résistante aux quinolones. L'hypersensibilité de la souche $\Delta cycC gyrA^{L83}$ est supprimée par l'allèle $parC^{K84}$, ce qui indique que l'hypersensibilité de la souche $\Delta cycC gyrA^{L83}$ aux quinolones résulte du ciblage de Topo IV (Figure 12). Si seule Topo IV est ciblée dans un mutant $\Delta cycC$, alors la sensibilité des cellules $cycC^+$ et $\Delta cycC$ aux quinolones doit être identique, en raison de la plus grande sensibilité aux quinolones de la Gyrase que Topo IV. Cependant, les cellules $\Delta cycC$ demeurent plus sensibles à la Norfloxacine que les cellules $cycC^+$ lorsque Topo IV est sauvage (un facteur 10 sépare la viabilité des cellules $cycC^+$ de celle des cellules $\Delta cycC$ (Figure 13). Nous avons également observé que l'introduction d'un allèle $parC^{K84}$ augmentait considérablement et spécifiquement l'hypersensibilité des cellules $\Delta cycC$ à la Norfloxacine (Figure 13). Ce résultat surprenant reste néanmoins compatible avec une implication de CycC dans l'activité spécifiée par Topo IV. Si Topo IV est impliquée dans la relaxation de l'ADN devant la fourche de réplication, alors la plus faible activité spécifiée par Topo IV du fait d'une combinaison entre la production d'une enzyme mutante et de l'absence de CycC contribue à l'accumulation de supertours positifs SC(+) devant la fourche de réplication, qui en retour conduisent à la formation d'un plus grand nombre d'adduits ADN::Gyrase, d'un plus grand nombre de collisions des RF dans ces adduits et donc a une plus grande sensibilité des cellules $\Delta cycC parC^{K84}$ à la Norfloxacine.

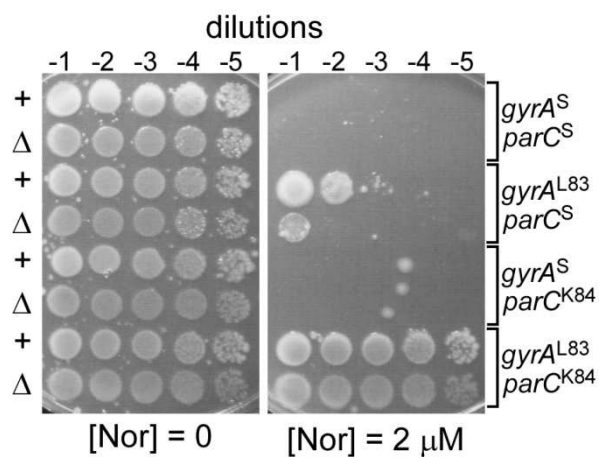


Figure 12 : le mutant $\Delta cycC$ est plus sensible à la Norfloxacin.

Huit souches spécifiant différentes combinaisons de Topoisomérase de type II résistantes (*gyrA^{L83}, parC^{K84}*) ou sensibles (*gyrA^S, parC^S*) aux quinolones ont été cultivées en milieu minimum à 30°C jusqu'à atteindre la phase exponentielle de croissance. Des dilutions en série de ces différentes souches (-1 à -5) ont ensuite été déposées sur boîtes en milieu MMA-Glucose complétées de la Norfloxacin (2 μM) ou sans Norfloxacin (0 μM). Δ , $\Delta cycC$; +, *cycC⁺*.

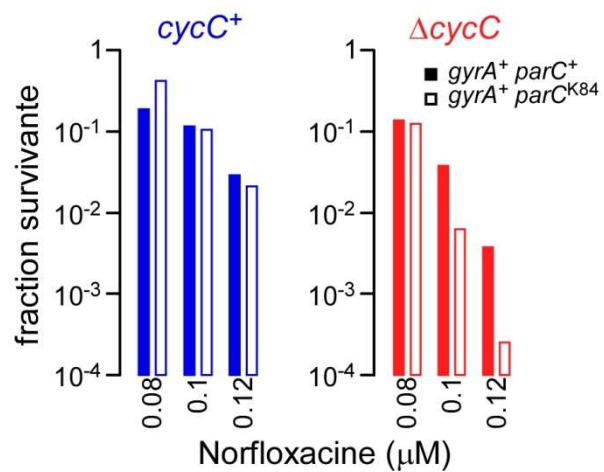


Figure 13 : Sensibilité des cellules *cycC*⁺ et Δ *cycC* spécifiant une Gyrase sauvage à la Norfloxacin. Des cellules cultivées en milieu minimum Glucose jusqu'à une DO₅₅₀ comprise entre 0,1 et 0,2 sont étalées sur boîtes complémentées en Norfloxacin. La fraction survivante correspond au rapport entre le nombre de colonies compté sur milieu complémenté en Norfloxacin et celui compté sur milieu sans drogue.

II-2-2) Topo IV est impliquée dans la relaxation de l'ADN devant la fourche de réplication

En premier lieu, nous avons cherché à vérifier l'implication de Topo IV dans la relaxation de l'ADN devant la fourche de réplication dans des conditions dans lesquelles la Gyrase est active. Lorsque la Gyrase est inactive, Topo IV peut relaxer de l'ADN *in vivo* et assurer la synthèse d'une certaine quantité d'ADN (Hardy and Cozzarelli, 2003). Néanmoins, cette activité n'est pas suffisante pour supprimer la thermosensibilité associée à un mutant *gyrB^{ts}* (Khodursky *et al.*, 2000).

Pour ce faire, nous avons mesuré la quantité d'ADN synthétisé en présence de Norfloxacin dans des cellules *cycC⁺* et Δ *cycC* synchronisées du point de vue de l'initiation de la réplication et spécifiant une Gyrase résistante à la Norfloxacin. La Norfloxacin est ajoutée dans les cultures immédiatement après initiation de la réplication. Ainsi, la quantité d'ADN synthétisée dans une cellule est proportionnelle au temps de réplication de l'ADN avant la collision d'une fourche de réplication dans un adduit ADN::Topo IV. Les cellules *cycC⁺* et Δ *cycC* ont été synchronisées au niveau de l'initiation de la réplication soit par DnaC2, soit par DnaA46 (figure 14A). Les cellules sont ensuite fixées, soit 40 minutes après initiation de la réplication (ce temps est inférieur à celui nécessaire pour effectuer un cycle complet jusqu'à la division, et approximativement suffisant pour terminer la réplication du génome). La quantité d'ADN synthétisée dans ces conditions expérimentales a été mesurée par cytométrie en flux (Methodologie dans Saifi and Ferat, 2012). La quantité d'ADN synthétisée pendant 40 minutes diminue avec la quantité de Norfloxacin, ce qui indique que Topo IV relaxe l'ADN devant la fourche de réplication lorsque la Gyrase est active (figure 14C). Afin de vérifier que la diminution de la quantité d'ADN synthétisée résulte du ciblage de Topo IV par la Norfloxacin, nous l'avons mesuré dans une souche spécifiant et une Gyrase et une Topo IV résistantes à la Norfloxacin (Figure 14C, courbes pointillées). La quantité d'ADN synthétisée dans la souche *gyrA^{L83} parC^{K84}* en absence ou en présence de Norfloxacin sont identiques

jusqu'à une concentration de 0,5 μ M (Figure 14C). Nous avons vérifié que la formation d'adduits derrière la fourche de réplication ne pouvait pas contribuer à déstabiliser le replisome. Si tel était le cas, il se pourrait que la diminution apparente de la quantité d'ADN synthétisée représente en fait l'accumulation des fourches de réplication arrêtées et non réactivées dans un mutant *dnaC2*. Cette expérience a été réalisée dans cellules synchronisées avec DnaA46, un variant thermosensible de la protéine d'initiation. La quantité d'ADN synthétisée dans les cellules synchronisées par DnaA46 est supérieure à celle synthétisée dans les cellules *dnaC2* (Figure 14B). Dans nos conditions expérimentales, les cellules sont synchronisées, c'est-à-dire qu'elles ne possèdent qu'une copie de leur génome. Ainsi, les collisions des RF dans un adduit ADN::Topo représente un arrêt définitif de la réplication, car celles-ci ne peuvent être réparées. Il est donc plutôt vraisemblable que la plus faible quantité d'ADN synthétisée dans les souches *dnaC2* résulte de la combinaison d'un avortement des fourches de réplication indépendant de la collision des fourches dans un adduit ADN::Topo, et d'un défaut de réactivation de ces dernières. Néanmoins, que les cellules aient été synchronisées par DnaC2 ou par DnaA46, les quantités d'ADN synthétisées dans les cellules *cycC*⁺ et Δ *cycC* ne sont pas significativement différentes. Nous concluons de cette série d'expériences 1) que Topo IV relaxe l'ADN, y compris lorsque Gyrase est active, et 2) que cette activité n'est pas affectée dans un mutant Δ *cycC*.

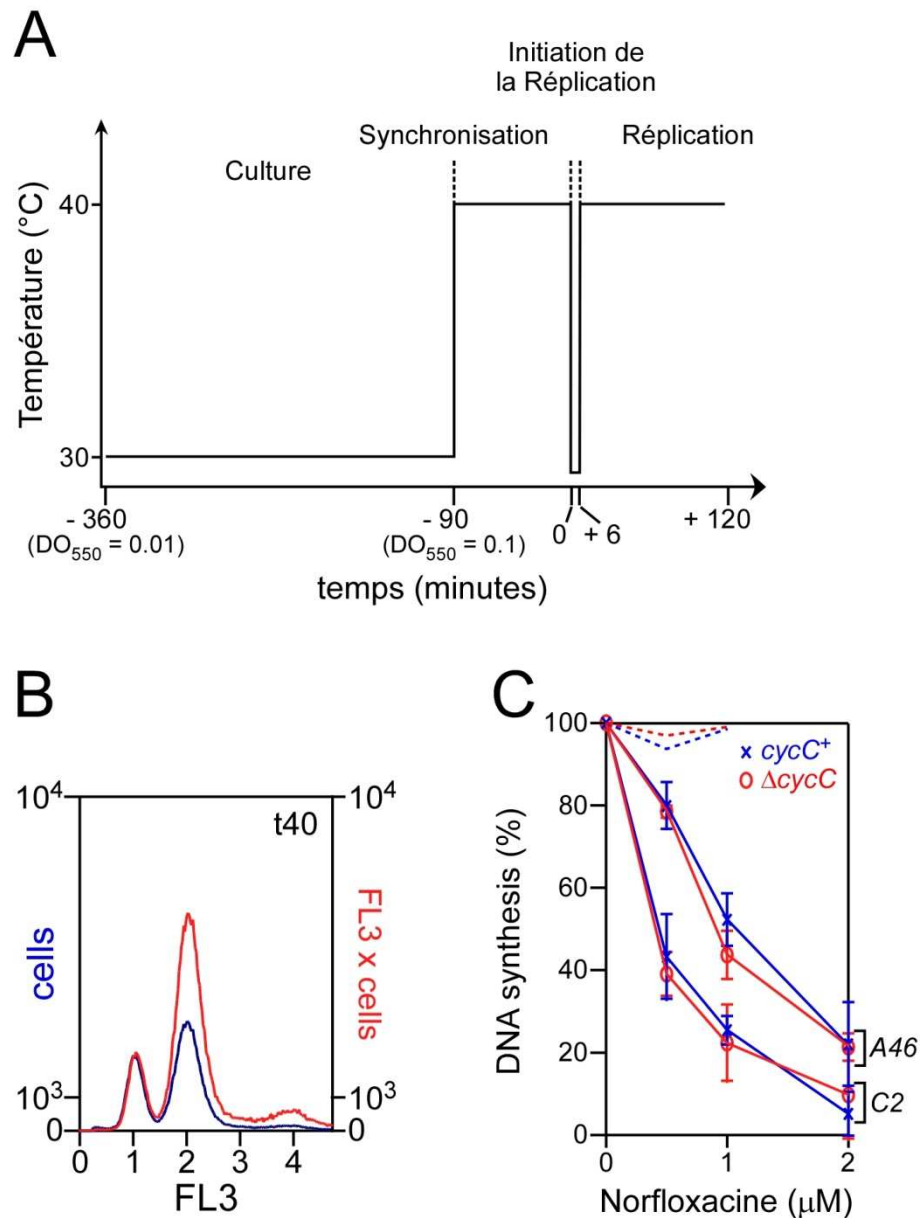


Figure 14 : Effet de *cycC* sur l'activité de relaxation de Topo IV. A - Protocole expérimental de synchronisation des cellules. Une dilution d'une culture de nuit est incubée à 30°C jusqu'à une DO₅₅₀ = 0,1 (phase exponentielle de croissance). Les cellules sont ensuite transférées à 40°C pendant 90 minutes de façon à les synchroniser au niveau de l'initiation de la réplication. L'initiation de la réplication est déclenchée en baissant la température à 30°C pendant 6 minutes. Ensuite, les cellules sont remises à 40°C pour éviter une nouvelle initiation de la réplication. La Norfloxacin est ajoutée 10 minutes après initiation de la réplication. B – Histogramme d'ADN de cellules fixées 40 minutes après initiation de la réplication (courbe bleue). La quantité d'ADN total a été calculée comme le produit de la valeur de FL3 par celle du nombre de cellules (courbe rouge). La quantité d'ADN a été estimée dans chaque échantillon. La fraction d'ADN synthétisée pour une condition donnée a été estimée comme la différence entre la quantité d'ADN présente dans l'échantillon 40 minutes après initiation (D₄₀) et celle présente dans l'échantillon 10 minutes après initiation de la réplication (D₁₀) rapportée sur D₁₀, $\Sigma = (D_{40} - D_{10})/D_{10}$. Le taux de réplication en présence de Norfloxacin a été estimé comme suit, $\Sigma_{(Nor)} = (D_{40(Nor)} - D_{10})/D_{10}$ et le pourcentage d'ADN synthétisé dans une condition donnée est $[(\Sigma_{(Nor)} / \Sigma) \times 100]$. C – Représentation graphique des valeurs $[(\Sigma_{(Nor)} / \Sigma) \times 100]$ en fonction de la concentration en Norfloxacin dans les cellules

II-2-3) L'activité de décaténation de Topo IV n'est pas affectée dans un mutant $\Delta cycC$

Puisque l'hypersensibilité des cellules $\Delta cycC$ à la Norfloxacine n'est pas associée à l'activité de relaxation de l'ADN spécifiée par Topo IV, nous avons cherché à déterminer si elle pouvait résulter du ciblage de l'activité de décaténation spécifiée par Topo IV. Nous avons testé cette hypothèse en mesurant le taux d'inhibition de la division cellulaire en réponse à la Norfloxacine. Nous avons considéré qu'un défaut de résolution des caténanes pourrait bloquer ou interférer avec le déroulement de la division cellulaire. Nous avons ajoutée la Norfloxacine dans des cultures de cellules synchronisées, différents temps après initiation de la réplication dans des cultures de cellules $gyrA^{L83}cycC^+$ et $gyrA^{L83}\Delta cycC$ (Figure 15).

L'ajout de Norfloxacine pendant la réplication (entre 20 et 40 min.) inhibe sévèrement la division cellulaire dans les cultures de cellules $cycC^+$ et $\Delta cycC$. L'inhibition de la division cellulaire, qui est identique dans les cellules sauvages et mutantes, est une fonction quasi linéaire du temps (1 et 2 μM). Cette inhibition provient vraisemblablement du ciblage de l'activité de relaxation de l'ADN par Topo IV pendant la réplication. Lorsque la Norfloxacine est ajoutée 40 minutes après initiation de la réplication (c'est-à-dire, à la fin de la réplication, (espeli O *et al.*, 2003)), l'inhibition de la division cellulaire en réponse à la Norfloxacine est indétectable à une concentration de 1 μM et seulement de 10 %, à une concentration de 2 μM . Puisque Topo IV est ciblée par la Norfloxacine dans les cellules $gyrA^{L83}$ aux concentrations de 1 et 2 μM (Figure 12 et 14), nous concluons que les adduits formés dans ces cellules pendant la décaténation de l'ADN ne sont pas présents en quantité suffisante pour bloquer significativement la division cellulaire. Toutefois, la modeste inhibition de la division cellulaire lorsque la drogue est présente à une concentration de 2 μM , mais identique dans un fond génétique $cycC^+$ et $\Delta cycC$, indique que l'activité de décaténation spécifiée par Topo IV n'est pas affectée dans un mutant $\Delta cycC$. Nous concluons que la méthode que nous avons employée ne permet pas d'estimer l'inhibition de l'activité de décaténation spécifié par topo IV. Toutefois, les résultats que nous avons obtenus nous

permettent de conclure que l'hypersensibilité d'un mutant $\Delta cycC$ ne résulte pas du ciblage de l'activité de décaténation de Topo IV.

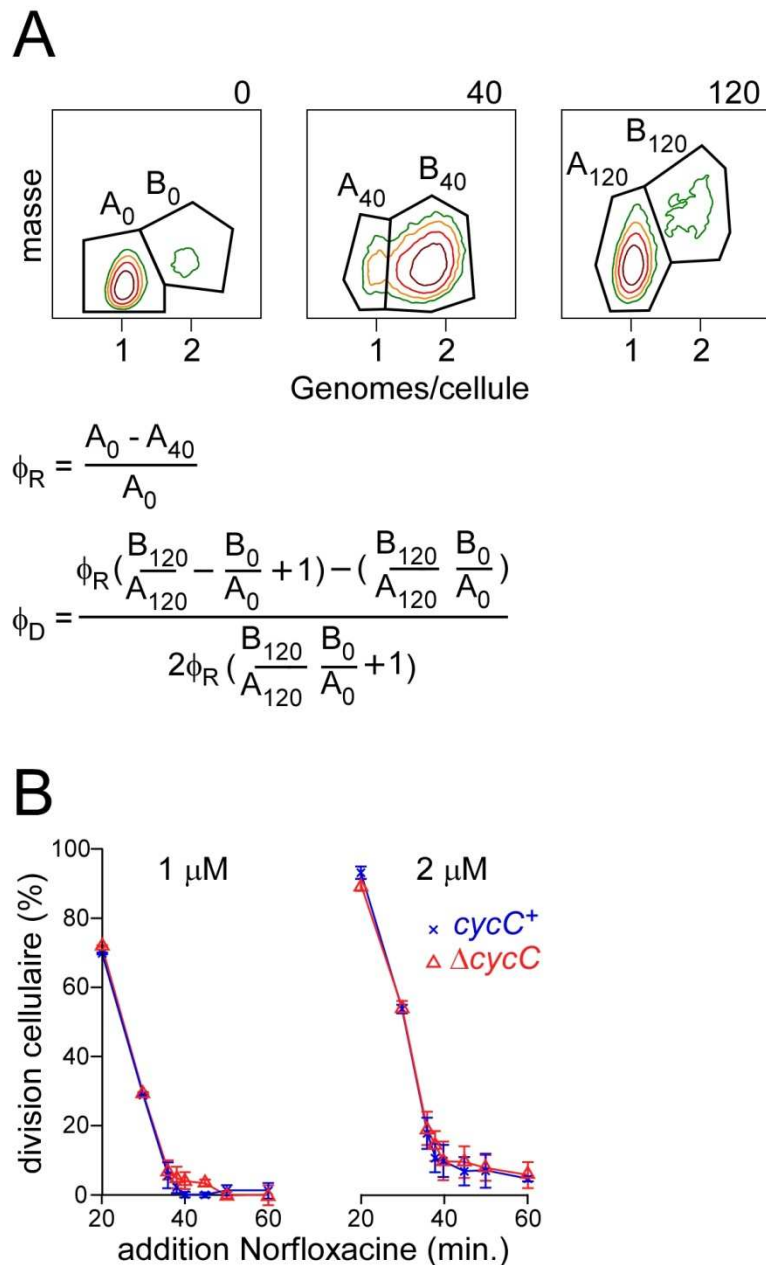


Figure 15 : la délétion de *cycC* ne modifie pas l'activité de décaténation de TopoIV. A – Méthodologie de calcul de l'inhibition de la division cellulaire en réponse à la Norfloxacin. Cytogrammes de cellules synchronisées 0, 40 et 120 minutes après initiation de la réplication. La quantité de cellules présentes dans les massifs de cellules contenant 1 (A) ou 2 génomes (B) est calculée à l'intérieur du polygone. Les formules permettant d'estimer la fraction des cellules ayant initiées la réplication (ϕ_R) et ayant divisées (ϕ_D) sont données. B – Efficacité de division cellulaire après traitement à la Norfloxacin des cellules *cycC*⁺ *gyrA*^{L83} et Δ *cycC* *gyrA*^{L83} synchronisées avec *dnaC2*. Les barres d'erreur correspondent à l'écart type autour de la moyenne de 3 expériences indépendantes.

II-2-4) La topologie de l'ADN n'est pas affectée dans un mutant $\Delta cycC$

Etant donné que nous n'avons pas pu connecter l'hypersensibilité des cellules $\Delta cycC$ à la Norfloxacin à une modulation de l'activité de Topo IV, nous avons cherché à vérifier si la topologie de l'ADN était affectée dans un mutant $\Delta cycC$. Nous avons utilisé la Novobiocine, qui est un vrai inhibiteur des Topoisomérases de type II, afin d'étudier l'impact de CycC sur la topologie de l'ADN. Les expériences présentées dans ce chapitre ont toutes été effectuées dans un fond génétique $\Delta acrA$. AcrA est un des composants de la pompe d'efflux des drogues dans *E. coli* (Okusu and Nikaido, 1996). Dans un mutant $\Delta acrA$ les drogues sont séquestrées dans la cellule. En conséquence, la concentration inhibitrice de Novobiocine est plus faible dans des cellules $\Delta acrA$ que dans les cellules $acrA^+$ (Khodursky *et al.*, 2000).

Dans un fond génétique $dnaC2$, les cellules $\Delta cycC$ sont également plus sensibles à la Novobiocine que les cellules isogéniques $cycC^+$. Nous avons analysé la topologie de plasmides extraits des souches $cycC^+$ et $\Delta cycC$ cultivées en présence de Novobiocine (Figure 16). Des cultures de cellules $cycC^+$ et $\Delta cycC$, transformées par un plasmide dérivé de pBR322, ont été incubées en présence de Novobiocine pendant 4H, avant d'être extraits. La distribution des topoisomères de ces plasmides a par la suite été analysée sur gel de Chloroquine (Figure 16). Dans toutes les conditions testées (avec ou sans Novobiocine), la distribution de Topoisomères des plasmides extraits des cellules $cycC^+$ et $\Delta cycC$ est identique.

Les mesures de l'activité de relaxation et de décaténation spécifiée par Topo IV nous ont permis d'exclure la possibilité que l'activité de Topo IV soit modulée par CycC. Le fait que la topologie de l'ADN n'est pas altérée dans un mutant $\Delta cycC$ nous permet à présent de conclure que CycC 1) ne module pas la topologie de l'ADN et 2) ne module pas l'activité des Topoisomérases de type II.

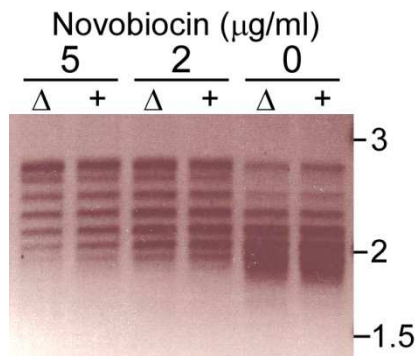


Figure 16 : La topologie de l'ADN n'est pas affectée dans un mutant $\Delta cycC$. Des cellules *dnaC2* et *dnaC2* $\Delta cycC$ ont été transformées par un plasmide dérivé de pBR322. Les ADN plasmidiques ont été extraits après une incubation de 4h à 30°C avec la Novobiocine à une concentration de 0, 2 et 5 $\mu\text{g/ml}$. Les ADN extraits ont été déposés sur un gel d'agarose (1%) complété en Chloroquine (20 $\mu\text{g/ml}$) et mis à migré à un voltage de 2V/cm pendant 4h. l'ADN a été révélée par l'addition de Bromure d'Ethidium. La position de migration de molécules d'ADN double brin linéaire de 1,5, 2 et 3 kbp est indiqué sur la droite du gel.

II-2-5) *CycC* n'affecte pas la vitesse de réplication

Nous nous sommes intéressés à mesurer la vitesse de réplication dans un mutant $\Delta cycC$, car une augmentation de celle-ci pourrait expliquer une augmentation d'autant de la fréquence des collisions des RF dans des adduits ADN:Topo et donc l'hypersensibilité des cellules $\Delta cycC$ à la Norfloxacin.

Le temps nécessaire à la réplication du chromosome d'*E. coli* est d'environ 40 minutes. Ce temps est indépendant du milieu de culture (Chandler *et al.*, 1975). Afin de tester l'hypothèse d'une accélération de la vitesse de réplication dans un mutant $\Delta cycC$, nous avons incubé des cultures synchronisées de cellules $cycC^+$ et $\Delta cycC$ à l'hydroxyurée (HU). HU inhibe la Ribonucléotide Réductase (Sinha and Snustad, 1972), l'enzyme responsable de la réduction des rNTP en dNTP et donc de la production du pool de nucléotides (Brown *et al.*, 1969). L'ajout de HU bloque la production de dNTP dans la cellule, ce qui a pour conséquence l'arrêt de la réplication et l'inhibition de la division cellulaire (Sinha and Snustad, 1972). L'expérience a été réalisée dans des cellules $cycC^+$ et $\Delta cycC$ synchronisées. Différents temps après initiation de la réplication, HU a été ajoutée aux cultures à une concentration inhibitrice (Figure 17). Des échantillons de culture ont été prélevés 120 minutes après initiation de la réplication et analysés par cytométrie en flux. La fraction de cellules ayant effectuées la division cellulaire a été estimée (Figure 17). La courbe d'inhibition de la division cellulaire est diphasique. La première partie de la courbe, jusqu'à 40 minutes, voit l'inhibition de la division cellulaire décroître de façon très importante avec le temps auquel HU est ajoutée ; cette phase rend vraisemblablement compte de l'effet de HU sur la synthèse d'ADN. Dans la seconde partie de la courbe (lorsque HU est ajoutée 40 minutes et plus après initiation de la réplication), l'inhibition de la division est toujours importante, mais moins marquée. Il est vraisemblable que 40 minutes après son initiation, la réplication soit finie dans la plupart des cellules. Il est possible que la faible inhibition de la division observée lorsque HU est ajoutée tardivement (après 60 minutes) corresponde à celle de la division dans les cellules dans lesquelles la réplication a dû être redémarrée. Les cellules ont été synchronisées par DnaA46 de façon à éviter l'interférence créée par la réactivation des

fourches de réplication dans un contexte *dnaC2*. Nous concluons de cette série d'expérience que la vitesse de progression de la fourche de réplication est identique dans une cellule *cycC*⁺ et une cellule Δ *cycC*.

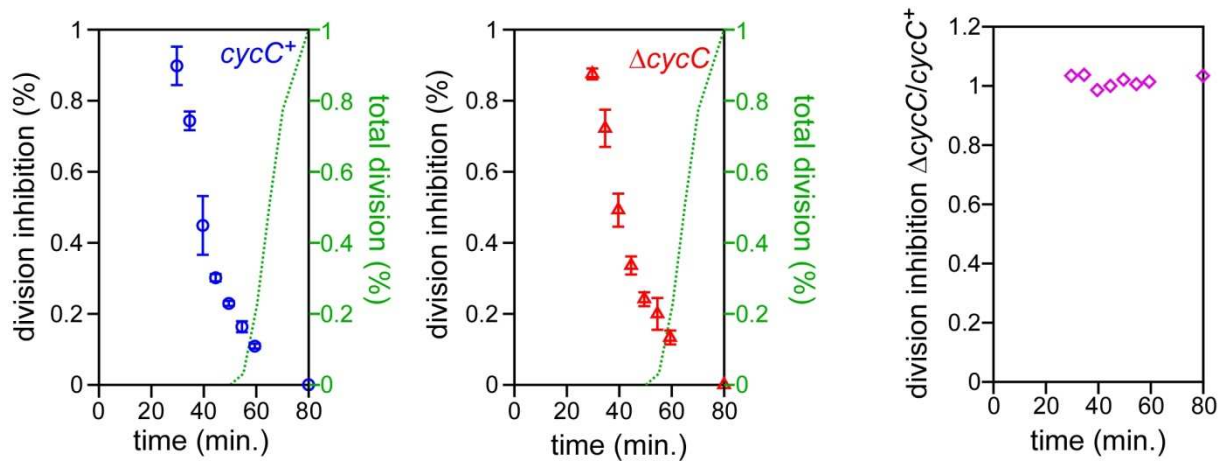


Figure 17 : la vitesse de réplication n'est pas modifiée dans un mutant Δ *cycC*. HU a été ajoutée à une concentration inhibitrice (125 μ M) dans des cultures de cellules *cycC*⁺ *dnaA46* et Δ *cycC* *dnaA46* synchronisées du point de vue de l'initiation de la réplication à différents temps après initiation de la réplication. Les cellules ont été fixées 120 minutes après initiation de la réplication et le taux de division cellulaire a été estimé par cytométrie en flux. La formule utilisée dans le calcul est indiquée dans la figure 18. Le taux d'inhibition de la division dans des cultures de cellules *cycC*⁺ et Δ *cycC* est présenté. L'évolution de la division cellulaire dans les cellules *cycC*⁺ et Δ *cycC* (courbe pointillée verte). Le rapport entre le taux d'inhibition de la division cellulaire dans les cellules Δ *cycC* et *cycC*⁺ reste constant et centré sur 1 (violet).

II-3) CycC et le redémarrage des fourches de réplication

II-3-1) La sensibilité des cellules $\Delta cycC$ à la Novobiocine est contexte génétique-dépendant

Nous avons investigué l'implication de CycC dans le redémarrage des fourches après avoir observé que la sensibilité des cellules $\Delta cycC$ dépendait de la nature de l'allèle *dnaC* présent dans la souche, nous avons observé avec surprise que l'hypersensibilité d'un mutant $\Delta cycC$ à la Novobiocine est effective dans un contexte génétique *dnaC2* mais pas dans un fond génétique *dnaC*⁺ (Figure 18). Nous avons élargi cette observation dans d'autres contextes génétiques ; la sensibilité des souches *cycC*⁺ et $\Delta cycC$ à la Novobiocine s'est révélée identique dans des mutants d'initiation de la réplication (*dnaA46*), des mutants de recombinaison (*ΔrecB*, *ΔruvC*), ainsi que dans un mutant de réactivation des fourches (*priA2*). Quoique surprenant, ces résultats sont compatibles avec une implication de CycC dans le redémarrage des RF, à condition que les RF inactivées puissent être redémarrées dans un mutant *dnaC2* à température non-permissive, mais qu'elles ne le soient pas dans les mêmes conditions lorsque CycC n'est pas présent. A cette condition seulement, l'hypersensibilité des cellules *dnaC2* $\Delta cycC$ à la Novobiocine pourrait s'expliquer par l'accumulation de RF inactivées dans la cellule.

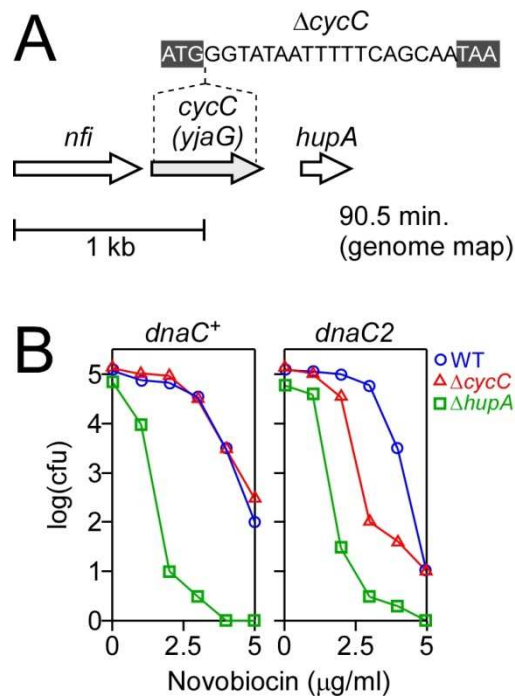


Figure 18 : un mutant $\Delta cycC$ est hypersensible à la Novobiocine dans un contexte génétique *dnaC2*. A – Le mutant $\Delta cycC$ correspond à une délétion en phase. La séquence restante de la phase ouverte est présentée. Les codons d’initiation et de terminaison sont encadrés. B – Les cellules *cycC*⁺ *hupA*⁺ (bleu), $\Delta cycC$ *hupA*⁺ (rouge) et *cycC*⁺ $\Delta hupA$ (vert), contenant soit l’allèle *dnaC*⁺, soit l’allèle *dnaC2* ont été mises en culture en LB jusqu’à être en phase exponentielle de croissance. Les cultures ont ensuite été étalées sur milieu LB complété avec de la Novobiocine. Les colonies ont été comptées après une incubation de 2 jours à 30°C.

II-3-2) Réactivation des RF dans un mutant *dnaC2* à température non-permissive

Résumé de l'article (Saifi and Ferat, 2012):

Dans cet article nous avons étudié l'activité de redémarrage des fourches de réplication dans un mutant *dnaC2* à température non-permissive. La différence d'hypersensibilité entre *dnaC2 cycC⁺* et *dnaC2 ΔcycC* à la Novobiocine permettait de suggérer que les RF dans les cellules *cycC⁺* avortaient moins souvent que les cellules *ΔcycC*, et donc que CycC pouvait être impliquée dans la stabilité des RF. Nous avons développé une méthodologie expérimentale afin de mesurer la quantité des RF désactivées qui résultent de par l'inhibition de la Gyrase. Au cours de cette étude nous avons montré que les cellules *dnaC2 priA2* accumulent plus de RF inactivées que les cellules *dnaC2 priA⁺* à température non-permissive.

Nous concluons que 60% des RF arrêtées sont réactivées dans un mutant *dnaC2* à température non-permissive.

Replication Fork Reactivation in a *dnaC2* Mutant at Non-Permissive Temperature in *Escherichia coli*

Boubekeur Saifi¹, Jean-Luc Ferat^{1,2*}

¹ Centre de Genetique Moleculaire du CNRS, Gif Sur Yvette, France, ² Universite de Versailles Saint Quentin, Versailles, France

Abstract

Replicative helicases unwind double-stranded DNA in front of the polymerase and ensure the processivity of DNA synthesis. In *Escherichia coli*, the helicase loader DnaC as well as factors involved in the formation of the open complex during the initiation of replication and primosomal proteins during the reactivation of arrested replication forks are required to recruit and deposit the replicative helicase onto single-stranded DNA prior to the formation of the replisome. *dnaC2* is a thermosensitive allele of the gene specifying the helicase loader; at non-permissive temperature replication cannot initiate, but most ongoing rounds of replication continues through to completion (18% of *dnaC2* cells fail to complete replication at non-permissive temperature). An assumption, which may be drawn from this observation, is that only a few replication forks are arrested under normal growth conditions. This assumption, however, is at odds with the severe and deleterious phenotypes associated with a null mutant of *priA*, the gene encoding a helicase implicated in the reactivation of arrested replication forks. We developed an assay that involves an abrupt inactivation of rounds of synchronized replication in a large population of cells, in order to evaluate the ability of *dnaC2* cells to reactivate arrested replication forks at non-permissive temperature. We compared the rate at which arrested replication forks accumulated in *dnaC2 priA⁺* and *dnaC2 priA2* cells and observed that this rate was lower in *dnaC2 priA⁺* cells. We conclude that while replication cannot initiate in a *dnaC2* mutant at non-permissive temperature, a class of arrested replication forks (PriA-dependent and DnaC-independent) are reactivated within these cells.

Citation: Saifi B, Ferat J-L (2012) Replication Fork Reactivation in a *dnaC2* Mutant at Non-Permissive Temperature in *Escherichia coli*. PLoS ONE 7(3): e33613. doi:10.1371/journal.pone.0033613

Editor: Martin G. Marinus, University of Massachusetts Medical School, United States of America

Received: December 13, 2011; **Accepted:** February 13, 2012; **Published:** March 19, 2012

Copyright: © 2012 Saifi, Ferat. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was supported by grants from Fondation Dina Surdin to BS under aegis of the Fondation de France. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: ferat@cgm.cnrs-gif.fr

Introduction

The processivity of DNA replication requires a 5'→3' replicative helicase - DnaB in *Escherichia coli* - to unwind double-stranded DNA in front of, and in interaction with, the replisome [1]. The hexameric DnaB protein forms a stable ring-shaped structure that needs to be opened prior to its placement on a single-stranded DNA. In *E. coli*, this function is ensured by DnaC, the helicase loader and a ring breaker [2], which remains stably bound to DnaB [3] until activation of the replicative helicase by the primase [4].

The replicative helicase needs to be loaded onto DNA at two different stages of DNA replication: the initiation of replication and the reactivation of arrested replication forks (RF). At the time of replication initiation, the complex DnaB₆DnaC₆ is recruited after the formation of the open complex [5] and involves the initiator protein, DnaA [6], and likely DiaA [7]. Other mechanisms are specified to reload the replicative helicase during RF reactivation. The most prominent pathway involves PriA and the primosomal proteins PriB and DnaT [8]. In this case, the 3'→5' helicase activity specified by PriA is required to make available a sufficient length of single-stranded DNA to allow the assembly of the primosomal proteins and the subsequent loading of DnaB onto the lagging strand [9]. Other proteins, such as Rep, which also specifies a 3'→5' helicase activity, and PriC

may have important functions during the reactivation of arrested RF [8–10].

dnaC2 is a thermosensitive mutant of the replicative helicase loader described as a slow stop mutant for DNA synthesis [11]: at non-permissive temperature, new rounds of replication cannot initiate while most ongoing rounds of replication continues through to completion [11]. The proportion of *dnaC2* cells in which replication is incomplete was estimated to be 18% at a non-permissive temperature of 38°C [12], which indicates that DnaC activity is not only indispensable for the initiation of replication but is also required during RF reactivation. Yet, the severe and deleterious phenotypes associated with a *priA2* null mutant, in which arrested RF cannot be reactivated (poor viability, UV sensitivity, phenotypically *rec*,...) [13], appear far more severe than what would be expected if a mere 18% of RF were arrested during DNA replication. This discrepancy suggests that the cells, in which arrested RF were not reactivated, represent only a fraction of those in which RF were inactivated.

To establish whether some arrested RF are reactivated in *dnaC2* cells at non-permissive temperature, we designed an assay allowing us to compare the accumulation of arrested RF in *dnaC2* cells at non-permissive temperature in a *priA⁺* and in a *priA2* background. To facilitate the measure, we inactivated abruptly a large quantity of RF in a population of synchronized

cells. We chose to inactivate RF with Novobiocin, a drug that inhibits type II topoisomerases and mainly Gyrase [14], after establishing that *priA2* cells were hypersensitive to Novobiocin. Gyrase eliminates the positive supercoils that accumulate in front of the RF and introduces negative supercoils ensuring the progression of the polymerase [15]. The accumulation of positive supercoils in front of the RF, when Gyrase is inhibited, halts the progression of the polymerase and eventually inactivates RF. We measured by flow cytometry the accumulation of inactivated RF in different genetic backgrounds and found that *dnaC2 priA2* cells accumulated 2.5 times more arrested RF than isogenic *priA⁺* cells at non-permissive temperature. This work led us to the identification of a new class of arrested RF - representing 60% of of them, whose reactivation depends on PriA but apparently not on DnaC activity. Implications in terms of DnaC2 activity at non-permissive temperature and in terms of the frequency of RF inactivation during normal growth are discussed.

Materials and Methods

Strains, chemicals and cultures

Strains used in this study and their genetic background are presented in Table 1. To increase the sensitivity of the cells to Novobiocin, a Δ *acrA* mutation was introduced in the strains used in this study [16]; *acrA* is a component of an efflux pump that expels various drugs in the medium, reducing their intracellular concentration. In a Δ *acrA* mutant, the amount of Novobiocin required to inhibit type II Topoisomerase activity is lower than in *acrA⁺* cells [14,17]. A *priA2* mutation is characterized by a high basal level of SOS induction [18]. Therefore, a *sfIA⁻* mutation was introduced in *priA2* strains to prevent filamentation [19]. *dnaC2* was P1 transduced from the original PC-2 strain [11]. A *mdoB::Tn* cassette [18] was first introduced within PC-2 to shuttle the *dnaC2* allele into CM735. The *dnaA46* strain is CM742 [20]. *priA2* cells were propagated with a pAM-*priA* plasmid until the

time of experiment and eliminated according to the protocol described in [19].

Cells were grown in minimal medium (K_2HPO_4 10.5 g/l, KH_2PO_4 4.5 g/l, $(NH_4)_2SO_4$ 1 g/l, Sodium Citrate 0.5 g/l) complemented with $MgSO_4$ 1 mM, $CaCl_2$ 0.1 mM and with Glucose (0.2% w/v) as a carbon source. The procedure of cell cycle synchronization has been described elsewhere [21].

When required, the following chemicals were added (final concentration): L-Histidine (40 μ g/ml), L-Tryptophane (40 μ g/ml), L-Methionine (40 μ g/ml), thiamine (1 μ g/ml), Spectinomycin (60 μ g/ml), Kanamycin (50 μ g/ml), Tetracycline (15 μ g/ml). Chemicals, antibiotics and amino acids were purchased from SIGMA and the culture reagents from DIFCO.

Flow cytometry analysis

Cells analyzed by flow cytometry were previously fixed by adding 5 volumes of ethanol 70% per volume of sample. Before analysis, the cells were washed twice in filtered TE [Tris-HCl (pH 7.5) 10 mM, EDTA (pH 8) 1 mM] and resuspended in TE supplemented with RNase A and Propidium Iodide (10 μ g/ml, each). A complete degradation of RNA was ensured by the incubation of the samples for 2 hours at 37°C prior to the cytometry analysis. Stained cells were excited at 532 nm with a Green NdYAG solid state laser. The light scattered by individual cells and the fluorescence emitted were detected, and amplified in a PARTEC Particle Analyzing System, PAS III. The forward scatter (FSC) gives a rough estimate of the cell mass, and the fluorescence signal emitted and recovered on the FL3 channel (>650 nm) was used to quantify the amount of DNA per cell. 100 000 cells were analyzed per run. Data were analyzed with the Flowmax software version 2.52.

RF inactivation and RF reactivation

The fraction of cells containing one genome before (t_0 , α_0), and 40 minutes after (t_{40} , α_{40}), the temperature downshift (initiation of replication), was measured on cytograms for each condition tested.

Table 1. Strains and plasmids used in this study.

Strains	Genotype	reference
BW25113	<i>lacIq rrmBT14 ΔlacZWI16 hsdR514 ΔaraBADAH33, ΔthaBADLD78</i>	[20]
CAG18430	<i>mdoB::Tn10</i>	[29]
CM735	<i>metE46, trp3, his4, thi1, galK2, lacY1 or lacZ4, mtl1, ara9, tsx3, ton1, rps8 or rps9, supE44 λ^-</i>	[20]
JJC1398	AB1157 <i>sfIA11 priA2::Kn/pAM-priA</i>	[19]
JW0452	BW25113 <i>acrA::Kn</i>	[16]
JW0941	BW25113 <i>sfIA::Kn</i>	[16]
NK9069	CM735 <i>dnaA46</i>	[20]
PC2	<i>leu6 thyA47 dra3 str153 dnaC2 dnaT12</i>	[11]
REP1329	CM735 <i>dnaC2 mdoB::Tn10</i>	This study
REP1952	CM735 <i>acrA::Kn</i>	This study
REP2139	CM735 Δ <i>sfIA(Kn⁺) ΔacrA(Kn⁺) priA2::Kn/pAM-priA</i>	This study
REP1986	CM735 <i>dnaC2 mdoB::Tn10 ΔacrA::Kn</i>	This study
REP2364	REP2139 <i>dnaC2 mdoB::Tn10</i>	This study
REP2370	REP2139 <i>dnaA46 tna::Tn10</i>	This study
REP2031	REP1952 <i>dnaA46 tna::Tn10</i>	
Plasmids	Description	reference
pAM- <i>priA</i>	Plasmid, whose replication is under the control of P_{lac} carrying a WT copy of <i>priA</i> .	[19]

doi:10.1371/journal.pone.0033613.t001

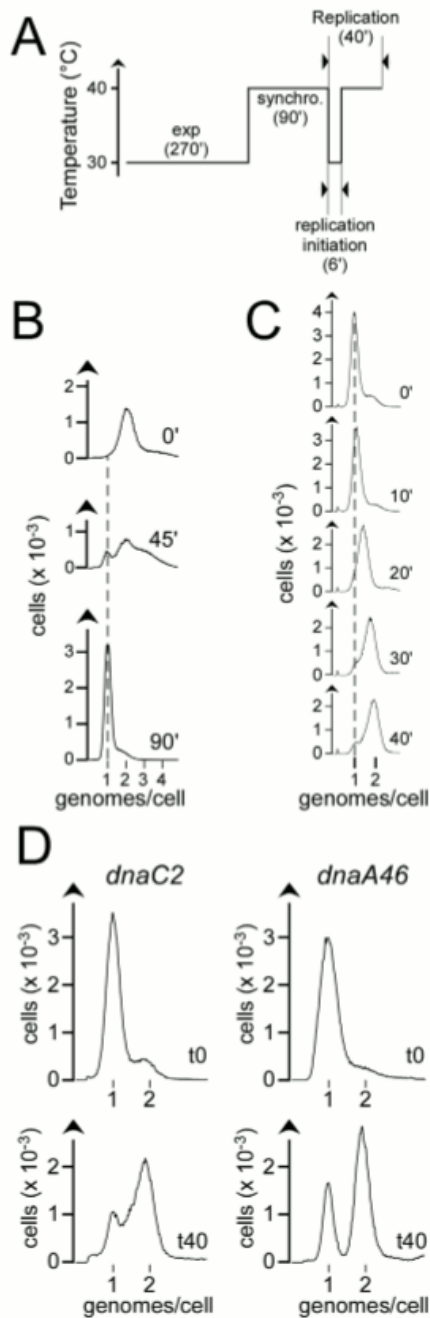


Figure 1. Experimental design. A – Synchronization procedure. A dilution of an overnight culture of *dnaC2* or *dnaA46* cells was grown during 3 generations at 30°C until exponential phase (exp) and then incubated at 40°C for 90 minutes (synchro) to synchronize the cells with respect to the initiation of replication. Replication was initiated by an abrupt downshift of the temperature of the culture to 30°C. 6 minutes after the temperature downshift, cultures were reincubated at 40°C to

prevent the initiation of new rounds of replication. Samples were taken 40 minutes after initiation of replication. Time in minutes is indicated in brackets. B – DNA histograms of a culture of exponentially growing *dnaC2* cells at 30°C before (0') and after being shifted to 40°C for 45 (45') and 90 minutes (90'). Similar DNA histograms were obtained with cultures of *dnaA46* cells (data not shown). After 90 minutes of incubation at non-permissive temperature, *dnaC2* and *dnaA46* cells are synchronized with respect to the initiation of replication. The dashed line indicates the position of the peak on a DNA histogram of stationary phase cells (i.e., cells containing one genome). C – DNA histograms of *dnaC2* cells harvested at different time points after the temperature downshift (0', 10', 20', 30' and 40'). The dashed line indicates the position of the peak on a DNA histogram of stationary phase cells (i.e., cells containing one genome). D – DNA histograms of synchronized *dnaC2* (left) and *dnaA46* cells (right) before initiation of replication (t0) and 40 minutes after replication initiation (t40). Replication was initiated by shifting abruptly the temperature from 40° to 30°C. After 6 minutes of incubation at a permissive temperature for the initiation of replication (30°C), the cells were brought back to 40°C. 40 minutes after initiation of replication, cells with active RF contain around two genomes.
doi:10.1371/journal.pone.0033613.g001

The fraction of cells with active RF at t40 was calculated as $\rho_{t40} = 1 - (\alpha_{t40} / \alpha_0)$. In order to assess the kinetics of RF inactivation in response to Novobiocin, we calculated the ratio $\rho_{t40} / \rho_{t40}^0$ for each time point and plotted the log value of these ratios over the time of incubation of Novobiocin at an inhibiting concentration. ρ_{t40}^0 represents the proportion of cells with active RF at t40 that were not incubated with Novobiocin. The function $\ln(\rho_{t40} / \rho_{t40}^0) = f(t)$ is a straight line, whose slope ($-\kappa$) identifies the rate at which inactivated RF accumulate when the cells are incubated with Novobiocin. The fraction of RF reactivated in *dnaA46* and in *dnaC2* cells at non-permissive temperature was calculated as: $1 - (\kappa_{piA}^+ / \kappa_{piA}^-)$.

Synchronization procedure

Overnight cultures of *dnaC2* or *dnaA46* cells were diluted in fresh MMA Glucose medium and grown at permissive temperature (30°C) for 3 generations (doubling time of 90 min.) until reaching log phase (OD₅₅₀ of 0.1). The cultures were then transferred into a shaking water bath preset at 40°C for 90 minutes to synchronize the cells with respect to replication initiation [21]. Replication was initiated by shifting abruptly the cultures to 30°C for 6 minutes. This operation was performed by the addition of an equal volume of 20°C-prewarmed fresh medium to the culture, followed by the incubation of the culture at 30°C in a shaking water bath. 6 minutes after the temperature downshift, the cells were reincubated at 40°C to prevent the initiation of additional rounds of replication (Figure 1A).

Results

Assessing the fraction of cells with active RF

The appreciation of the ability of *dnaC2* cells to reactivate arrested RF requires a precise evaluation of the proportion of cells with active RF in a given population, which is made possible by flow cytometry. The incubation of exponentially growing *dnaA46* cells – carrying a thermosensitive allele of the gene encoding the initiator protein - or *dnaC2* cells at a non-permissive temperature blocks the initiation of replication but neither ongoing rounds of replication, which continue through to completion, nor cell division. During an incubation of 90 minutes at a non-permissive temperature of 40°C, a population of *dnaC2* or of *dnaA46* cells is progressively enriched in cells containing a single genome (Figure 1A and 1B). After 90 minutes of such a treatment, most

cells contain one genome (cells with two or more genomes amount to a mere 10 to 15%); the cells are synchronized with respect to replication initiation (Figure 1B). At this stage, a short (6 minutes) and abrupt downshift of temperature to 30°C - of cultures of *dnaC2* and *dnaA46* cells pre-incubated for 90 minutes at 40°C - results in a synchronous initiation of replication in a large proportion of cells. The quantity of DNA (followed over FL3) in cells that initiated replication shifts over time from 1 to 2 genomes (Figure 1C). 40 minutes after the temperature downshift (t40), which corresponds to the period of time required to complete a round of replication (data not shown), *dnaC2* and *dnaA46* cells that initiate replication contain around 2 genomes. These cells are easily identifiable as a peak on DNA histograms (Figure 1D).

It is noteworthy that the peak of replicating cells is broader in a *dnaC2* background than in a *dnaA46* background (Figure 1D). The peak of *dnaC2* replicating cells overlaps partially with that of cells containing one genome while the peaks of *dnaA46* cells with one and with two genomes are relatively narrow and well separated (Figure 1D). From cell to cell, the quantity of DNA replicated in *dnaC2* cells during 40 minutes is more variable than in *dnaA46* cells. Assuming that the elongation rate of the DNA polymerase is not altered in a *dnaA46* and in a *dnaC2* background, the broader shape of the peaks observed with *dnaC2* cells at t40 likely reflects the fact that within this genetic background, rounds of replication were arrested and not reactivated at non-permissive temperature. Our data are therefore consistent with previously reported results (Maisnier-Patin et al, 2001), but still do not refute the possibility that some arrested RF be reactivated in *dnaC2* cells at non permissive temperature.

To shed light on this matter, we developed a method allowing us to measure the fraction of cells with active RF within a population.

Synchronized cells that initiated and completed a round of replication accumulate within the peak at 2 genomes per cell (Figure 2), while those in which replication did not initiate accumulate within the peak at one genome per cell. Cells in which 1 or 2 RF were arrested - before completion of replication - and not reactivated accumulate in the valley between 1 and 2 genomes per cell.

The drift of the peak on DNA histograms of cells harvested before, and 10 minutes after, the temperature downshift is almost negligible (Figure 1B). Therefore, cells in which both RF were arrested within 10 minutes after the initiation of replication and not reactivated, accumulate with those that did not initiate replication. Hence, and in order to assess the ability of *dnaC2* cells to reactivate arrested RF a large proportion of RF was transiently inactivated soon after initiation of replication in a synchronized population of cells. Then, the cells were brought back to growth conditions permissive with respect to replication. Under such experimental conditions, cells in which replication did not initiate and those in which both RF were arrested - during the inactivation procedure - and not reactivated, accumulate within the peak at one genome (Materials and Methods). We turned to the analysis of cytograms, in which the DNA content (given by the FL3) is plotted over the FSC, which gives a rough estimate of cell mass, to delineate more precisely the fraction of cells with one genome (Figure 2). Given this starting situation, the proportion of cells undergoing replication under a given condition (ρ_{10}) can be extracted from the fraction of cells with one genome at t0 (α_0) and t40 (α_{40}) (Figure 2, Materials and Methods).

Inactivating RF with Novobiocin

We developed a procedure to generate a large quantity of arrested RF in cultures of synchronized cells to assess the capacity

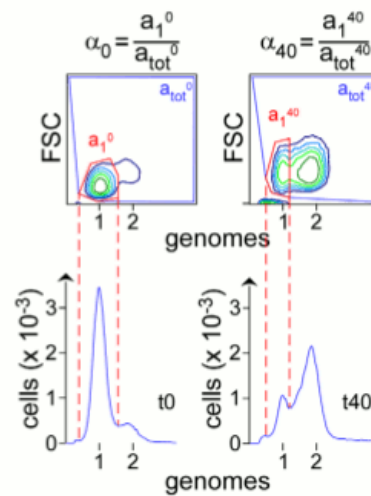


Figure 2. Assessment of the proportion of cells with active RF in a population of synchronized cells. Contour plot of cytograms (FL3 [DNA] vs. FSC [mass], top) and DNA histograms (bottom) of *dnaC2* synchronized cells before (t0) and 40 minutes after replication initiation (t40). Cells with one genome at t0 and at t40 (a_1^0 and a_1^{40}) are circled in red on cytograms. The corresponding peaks are delineated by dashed lines on DNA histogram. The total amount of cells within the samples (a_{tot}^0 and a_{tot}^{40}) is circled in blue on cytograms. The formula above the cytograms were used to calculate the proportion of cells with one genome at t0 and at t40 (α_0 and α_{40}) and then the proportion of cells with active RF (ρ_{40}) (Materials and Methods). doi:10.1371/journal.pone.0033613.g002

of *dnaC2* cells to reactivate RF at non-permissive temperature. We decided to target Gyrase because PriA was shown to be essential in gyrase point mutants, revealing a high rate of RF inactivation in these strains; the mediocre activity specified by Gyrase mutant proteins and the resulting accumulation of positive supercoils in front of the polymerase was proposed to be responsible for the high rate of RF inactivation [19]. Novobiocin is a Gyrase inhibitor. Topo IV, the topoisomerase implicated in the resolution of (pre)catenated DNA that accumulates behind the RF [22], is also targeted by Novobiocin. Yet, Topo IV is much less sensitive to Novobiocin than Gyrase [14], implying that Gyrase is the primary target of Novobiocin. We verified whether the Novobiocin-induced inhibition of Gyrase could inactivate RF by assessing the sensitivity of a *priA2* mutant - a mutant in which most arrested RF is not reactivated - to Novobiocin. *priA*⁺ and *priA2* mutant cells were plated on minimal medium in which Novobiocin was added at different concentrations. At a concentration of Novobiocin of 1 µg/ml, the colony-forming unit (cfu) of *priA2* cells was around 1/10,000 that measured without Novobiocin. In contrast, the viability of *priA*⁺ cells was unaffected by Novobiocin up to a concentration of 2 µg/ml (Figure 3A). This result indicates that Novobiocin induces the inactivation of RF.

dnaC2 cells synchronized with respect to replication were treated 10 minutes after replication initiation and during 30 minutes with Novobiocin at different concentrations and then analyzed by flow cytometry (Figure 3B, Materials and Methods). Under these conditions, the peak centered at one genome identifies the cells that did not initiate replication and those in which the two RF were inactivated in response to Novobiocin. The proportion of

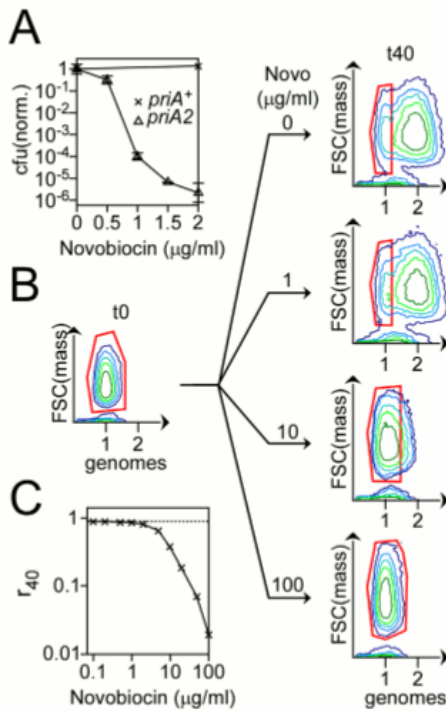


Figure 3. Effect of Novobiocin on RF inactivation. A – *priA*⁺ (x) and *priA2* cells (Δ) were grown to log phase in minimal Glucose medium, diluted and plated on minimal Glucose plates to which Novobiocin was added. Colonies were counted after 3 days of incubation at 30 °C, normalized to the cfu calculated in absence of Novobiocin and plotted over the concentration of Novobiocin. Error bars indicate the standard deviation around the mean in three independent experiments. B – Contour plots of *dnaC2* cells before replication initiation (t0) and 40 minutes after initiation of replication (t40). Cells that initiated replication were incubated 10 minutes after initiation of replication with different concentrations of Novobiocin for 30 minutes. The final concentration of Novobiocin (in μg/ml) is indicated above the arrows. Cells containing one genome at t0 or at t40 are circled in red. C – The proportion of *dnaC2* cells with active RF under each condition tested (ρ_{40} , Materials and Methods) was plotted over the range of concentrations of Novobiocin tested. doi:10.1371/journal.pone.0033613.g003

cells with active RF was measured (Materials and Methods) for each condition (Figure 3B) and then plotted over the range of concentrations of Novobiocin tested (Figure 3C). Up to a concentration of 2 μg/ml, Novobiocin has virtually no effect on the proportion of cells with active RF (Figure 3C). In contrast, the proportion of cells with active RF was significantly reduced when the concentration of Novobiocin was at least 5 μg/ml (Figure 3C). We chose to generate arrested RF by treating cultures of cells with Novobiocin at a concentration of 10 μg/ml (an “inhibiting” concentration) because a large quantity of RF are inactivated at this concentration of drug; the fraction of cells with active RF was estimated to be less than 40% (Figure 3C). A concentration of 10 μg/ml of Novobiocin was also chosen because a 10 fold

dilution brings the drug to a concentration at which the proportion of cells with active RF is merely 1.9% less than that measured in cultures of untreated cells (Figure 3C).

RF are reactivated in *dnaC2* cells at non-permissive temperature

Novobiocin was added to synchronized cultures of *priA*⁺ and *priA2* cells to a final concentration of 10 μg/ml, 10 minutes after replication initiation and for a length of time ranging from 1 to 10 minutes. Then the cultures were diluted to bring Novobiocin to a concentration at which the drug has an insignificant effect on Gyrase activity in *dnaC2* cells (1 μg/ml). 40 minutes after initiation of replication, samples of cells were taken, fixed and processed for flow cytometry analysis (procedure summarized in Figure 4A). The experiment was performed in a *dnaC2* (Figure 4B) and in a *dnaC2*⁺ background (Figure 4C). In the latter case, cells were synchronized with *dnaA46*.

It was shown in *dnaC2* cells that the inactivation of one RF does not affect the fate of the other RF present in the cell [12]. Hence, we measured the rate at which cells with two inactive RF were generated, which corresponds to the rate at which the last RF was inactivated, to estimate the rate of RF inactivation in response to Novobiocin. We followed the fraction of cells with active RF for each strain tested over the time of incubation with Novobiocin at an inhibiting concentration (Materials and Methods). ρ_{40} was measured for each time point, divided by ρ_{t0}^0 (where ρ_{t0}^0 is the fraction of cells with active RF in the absence of Novobiocin) and the logarithm value of these ratios were plotted over the time of incubation of the cultures at an inhibiting concentration of Novobiocin (Figure 4B and 4C). For each strain, the distribution of these values fits best with a linear distribution (coefficient of determination, R^2 , above 0.99), which indicates that RF inactivation in response to Novobiocin is a first-order reaction. For each series of data, the linear regression was assessed and the slope ($-\kappa$) was extracted (Figure 4B and 4C). κ represents the rate at which inactivated RF accumulate during the experiment. The values of κ calculated in a *dnaC2 priA2* ($0.084 \pm 0.012 \text{ min}^{-1}$) and in a *dnaC2+ priA2* background ($0.09 \pm 0.009 \text{ min}^{-1}$) are not significantly different, which indicates that *priA2* is epistatic to *dnaC2*. Strikingly, the value of κ calculated in a *dnaC2 priA+* background ($0.033 \pm 0.004 \text{ min}^{-1}$) is much lower than that calculated in a *dnaC2 priA2* background. This result indicates that *dnaC2 priA+* cells accumulate less arrested RF than *dnaC2 priA2* cells in response to Novobiocin.

Discussion

The primary result of this study is that *dnaC2 priA2* cells accumulate more inactivated RF at non-permissive temperature than *dnaC2 priA+* cells when the cells are treated with Novobiocin, a drug that inhibits Gyrase. Two points, however, need further clarification in order to conclude definitively from these data that *dnaC2* cells can reactivate arrested RF at non-permissive temperature. The first point regards the direct link that we drew between the inhibition of Gyrase and the inactivation of RF. We clarified this point by plating *priA2* and *priA+* cells on a medium supplemented with Novobiocin. The rationale behind this experiment was based on the requirement of the helicase activity specified by PriA and the following recruitment of the primosomal proteins for the reactivation of arrested RF [9]. Another pathway – driven by PriC and independent of PriA – was deduced from the synthetic lethality associated with a double mutant *priA priC* [8]. Yet, the absence of phenotype attributable to a *priC* single mutant led to the assumption that the PriA-driven mechanism was the

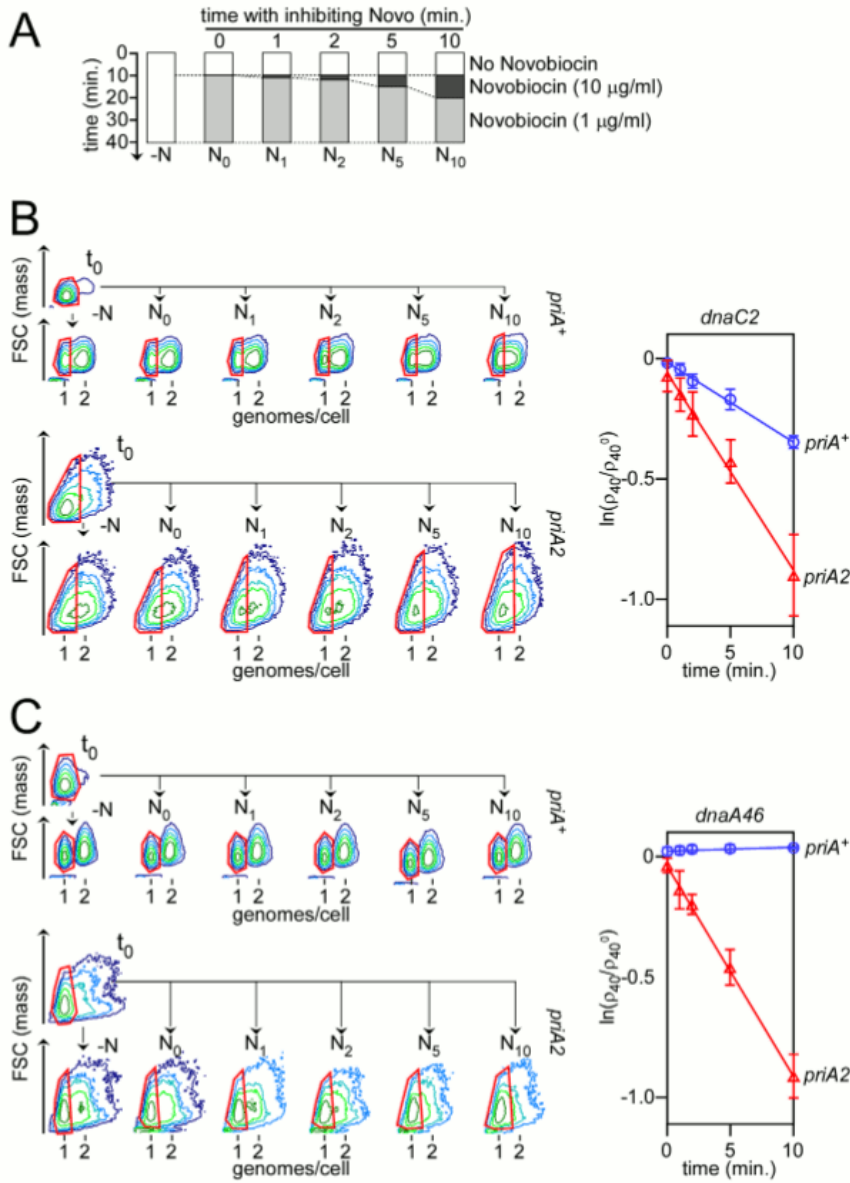


Figure 4. RF reactivation in *dnaC2* cells at non-permissive temperature. A – Schematic description of the experimental procedure. Replication is initiated synchronously at t_0 . 10 minutes after replication initiation, Novobiocin is added to the cultures at an inhibiting concentration (dark grey) before being brought back to a permissive concentration (light grey) until the end of the experiment. A control sample, not treated with Novobiocin, (-N) was also analyzed. Samples incubated with Novobiocin (N_i) are identified by the time 'i' (in minutes) of incubation at a concentration of Novobiocin of 10 $\mu\text{g/ml}$. B – Contour plots of *dnaA*⁺ *dnaC2* cells before (t_0) and after initiation of replication (-N, N₀, N₁, N₂, N₅ and N₁₀) in *priA*⁺ (top) and *priA2* cells (bottom). The fraction of cells with active RF (p_{40}) under each condition tested was normalized to that of cells that were not incubated with Novobiocin (p_{40}^0), and the logarithm value of these ratios was plotted over the time of incubation with Novobiocin at

10 $\mu\text{g/ml}$ (plot on the right). Circles (*priA*⁺) and triangles (*priA2*) identify the average value for a given time point, and error bars correspond to the standard deviation around the mean in three independent experiments. C – Same as B except that the cells analyzed are *dnaA46 dnaC*⁺ and that error bars for *priA*⁺ cells correspond to the standard deviation around the mean in two independent experiments.
doi:10.1371/journal.pone.0033613.g004

major RF reactivation pathway. Thus and despite the existence of an alternative pathway for RF reactivation, we reasoned that the inhibition of Gyrase by Novobiocin, if it results in the inactivation of RF, ought to reduce dramatically the viability of *priA2* mutant cells at low concentration of drug. We established indeed that *priA2* cells are much more sensitive to Novobiocin than *priA*⁺ cells (Figure 3A) and concluded that the Novobiocin-induced inhibition of Gyrase leads to RF inactivation. The second point concerns the rate at which RF are inactivated in *dnaC2* and in *priA2* cells in response to Novobiocin. This point requires a clarification as well because a faster rate of RF inactivation in *priA2* than in *priA*⁺ cells, or the destabilization of active RF caused by the absence of the PriA protein could alternatively explain the larger proportion of cells with arrested RF in a *dnaC2 priA2* than in a *dnaC2 priA*⁺ background. This hypothesis, however, may be excluded since PriA interacts with DNA after RF inactivation – and not before [9]. We may also exclude the possibility that a ΔsfIA mutation – which we introduced in *priA2* cells to prevent the *priA2*-induced SOS response to inhibit cell division – modulate the stability of RF or the rate at which they are inactivated since we established that the rate, at which inactivated RF accumulate, was identical in *dnaC2 sfIA*⁺ and in *dnaC2 sfIA*⁻ cells (data not shown). An additional point may be made with regards to the SOS response: is it possible that the SOS response, which is induced in *dnaC2* cells at non-permissive temperature [23], modifies the fate of ongoing rounds of replication? In this respect, an over-stabilization of active RF in *dnaC2* cells in response to the induction of the SOS response may be excluded since this response is induced in *priA2* cells as well. We therefore conclude that the same quantity of RF was inactivated in *dnaC2 priA*⁺ and in *dnaC2 priA2* cells during the Novobiocin treatment.

We considered also the possibility that some inducible Stable DNA replication (iSDR) – induced during the SOS response [24] – be initiated in *dnaC2* cells and misinterpreted as RF reactivation. For this hypothesis to be valid, however, one would have to assume that the replicative helicase can be loaded in *dnaC2* cells at non-permissive temperature as well, since DnaC and PriA activities were shown to be required for the initiation of iSDR [25–26].

The reduced cfu of *priA2* cells grown with Novobiocin at a concentration of 1 $\mu\text{g/ml}$ indicates that RF are also inactivated at this concentration of drug (Figure 3A). Hence, one may argue that in addition to the RF that were inactivated during the incubation of the cells with Novobiocin at a concentration of 10 mg/ml , other RF were inactivated during the so-called ‘permissive conditions’ of our experiment, i.e., after Novobiocin was diluted to a concentration of 1 $\mu\text{g/ml}$. The quantity of inactivated RF was estimated. The proportion of cells with active RF was merely reduced by 1.9 and 4.5% in *dnaC2 priA*⁺ and *dnaC2 priA2* cells, respectively, after a 30 minutes incubation of the cells with Novobiocin at a concentration of 1 $\mu\text{g/ml}$ (condition N₀ in Figure 4). In contrast, the proportion of *dnaC2 priA*⁺ and *dnaC2 priA2* cells with active RF was reduced by 30 and 60%, respectively, after a 10 minutes incubation of the cells with Novobiocin at a concentration of 10 $\mu\text{g/ml}$. Thus, and although the objection is legitimate, we considered the fraction of cells in which RF were inactivated during the incubation of the cells with Novobiocin at 1 $\mu\text{g/ml}$ to be low enough to be insignificant. Hence, the calculation of the proportion of cells with active RF

after 40 minutes of treatment with Novobiocin, as presented here, is appropriate and meaningful to determine whether arrested RF were or were not reactivated in *dnaC2* cells at non-permissive temperature.

dnaC2 priA2 and *dnaC*⁺ *priA2* cells accumulate inactivated RF at a similar rate in response to Novobiocin (0.084 and 0.09 min^{-1} in *dnaC2 priA2* and *dnaC*⁺ *priA2*, respectively), which indicates that the rate at which *priA2* cells accumulate inactivated RF is independent of the allele of *dnaC*. Under the same experimental conditions, *priA*⁺ *dnaC2* cells accumulate inactivated RF at a much lower rate (0.033 min^{-1}), while inactivated RF were undetectable in *priA*⁺ *dnaA46* cells; the reactivation of a fraction of arrested RF is dependent on DnaC, in agreement with previous results [12]. Altogether, these results indicate that among the arrested RF, 40% need active DnaC for their reactivation, while 60% do not. (Materials and Methods). Granted that around 18% of *dnaC2* cells fail to complete replication when cultivated at non-permissive temperature (i.e., cells in which arrested RF were not reactivated) [12], and assuming that the efficiency of RF reactivation in *dnaC2* cells at non-permissive temperature is the same with and without Novobiocin, we may conclude that around 45% of replications are arrested before completion, under normal growth conditions.

This study raises new questions about the activity and the function specified by DnaC2 at non-permissive temperature. Can DnaB be loaded onto DNA without the assistance of DnaC? The replicative helicase is extremely stable as a hexameric ring and DnaC is referred to as a ring breaker in *E. coli* because it catalyzes the opening of the ring, which is required to place the helicase onto single-stranded DNA [2]. Thus, the loading of DnaB on DNA without the help of a loader may be excluded. Is it possible, however, that another factor specify the function of loading the replicative helicase onto DNA? During the replication of the bacteriophage lambda, for example, the loading of DnaB at the origin of replication of the phage is ensured by the phage protein λP and not by DnaC [27]. Our strain is devoid of lambda [20] and the inspection of its genome (through BLAST) did not reveal the presence of close or distantly related copies of the lambda P gene. Yet, we cannot exclude that an alternative replicative helicase loading system be specified in *E. coli*. Since *dnaC* is an essential gene, however, such an alternative replicative helicase loading system ought to work specifically during the reactivation of arrested RF and not during the initiation of replication.

Is DnaC systematically required to reactivate arrested RF? If DnaB were still present on arrested RF, for example, its reactivation should not require DnaC. Such a situation should not require PriA either, because the very function of PriA is to assist the loading of the replicative helicase onto DNA [9]. Thus, this hypothesis may be excluded. We may instead consider that DnaC2 is active for reloading DnaB at arrested RF and at non-permissive temperature. Yet, if DnaB can be loaded at arrested RF by DnaC2 at non-permissive temperature, why cannot DnaB be loaded at *oriC* by DnaC2 during the initiation of replication? The fact that different partners are involved in the recognition of the helicase complex is most certainly part of the answer. During replication initiation at *oriC*, the replicative helicase complex interacts directly with DnaA [6], while the replicative helicase is presented to a complex composed of primosomal proteins during the reactivation of the RF [9]. It is tempting to speculate that the aptitude of the DnaC2 mutant protein to load the replicative

helicase at non permissive temperature reflects indirectly a property acquired by the helicase loader through evolution. While RF reactivation is vital for the cell and has to be ensured by any means, the blockage of the loading of the replicative helicase during replication initiation is not deleterious and may – in addition to the already known activities regulating this stage [28] – bring an additional level of control for the cell to verify that the conditions are appropriate to initiate replication of the chromosome. Thus, it is possible that structural peculiarities of the primosomal complex, specific interactions between the primosomal complex and the helicase complex, or even an as yet unknown additional factor, facilitate specifically the loading of the helicase during RF reactivation.

References

- Kim S, Dallmann HG, McHenry CS, Marians KJ (1996) Coupling of a replicative polymerase and helicase: a tau-DnaB interaction mediates rapid replication fork movement. *Cell* 84: 643–650.
- Davey MJ, O'Donnell O (2003) Replicative helicase loaders: ring breakers and ring makers. *Curr Biol* 13: R594–596.
- Galletto R, Jezewska MJ, Bujalowski W (2003) Interactions of the *Escherichia coli* DnaB Helicase hexamer with the Replication Factor the DnaC Protein. Effect of Nucleotide Cofactors and the ssDNA on Protein-Protein Interactions and the Topology of the Complex. *J Mol Biol* 329: 441–465.
- Makowska-Grzycka M, Kagami JM (2010) Primase directs the release of DnaC from DnaB. *Mol Cell* 37: 90–101.
- Kornberg A, Baker TA (1992) DNA Replication. Freeman; San Francisco.
- Mott ML, Erzberger JP, Coons MM, Berger JM (2008) Structural synergy and molecular crosstalk between bacterial helicase loaders and replication initiators. *Cell* 135: 623–634.
- Keyamura K, Abe Y, Higashi M, Ueda T, Katayama T (2009) DiaA dynamics are coupled with changes in initial origin complexes leading to helicase loading. *J Biol Chem* 284: 25038–25050.
- Sandler SJ (2000) Multiple genetic pathways for restarting DNA replication forks in *Escherichia coli* K-12. *Genetics* 155: 487–497.
- Heller RC, Marians KJ (2006) Replisome assembly and the direct restart of stalled replication forks. *Nat Rev Mol Cell Biol*. pp 932–943.
- Heller RC, Marians KJ (2007) Non-replicative helicases at the replication fork. *DNA Repair (Amst)* 6: 945–952.
- Carl PL (1970) *Escherichia coli* mutants with temperature-sensitive synthesis of DNA. *Mol Gen Genet* 109: 107–122.
- Maisnier-Patin S, Nordström K, Dasgupta S (2001) Replication arrests during a single round of replication of the *Escherichia coli* chromosome in the absence of DnaC activity. *Mol Microbiol* 42: 1371–1382.
- Sandler SJ, Samra HS, Clark AJ (1996) Differential suppression of priA2::kan phenotypes in *Escherichia coli* K-12 by mutations in priA, lexA, and dnaC. *Genetics* 143: 5–13.
- Khodursky AB, Peter BJ, Schmid MB, DeRisi J, Botstein D, et al. (2000) Analysis of topoisomerase function in bacterial replication fork movement: use of DNA microarrays. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 9419–9424.
- Cozzarelli NR (1980) DNA gyrase and the supercoiling of DNA. *Science* 207: 953–960.
- Baba T, Am T, Hasegawa M, Takai Y, Okumura Y, et al. (2006) Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection. *Mol Syst Biol* 2: 1–11.
- Okusu H, Ma D, Nikaido H (1996) AcrAB efflux pump plays a major role in the antibiotic resistance phenotype of *Escherichia coli* multiple-antibiotic-resistance (Mar) mutants. *J Bacteriol* 178: 306–308.
- Nurse P, Zavitz KH, Marians KJ (1991) Inactivation of the *Escherichia coli* priA DNA replication protein induces the SOS response. *J Bacteriol* 173: 6686–6693.
- Grompone G, Ehrlich SD, Michel B (2003) Replication restart in gyrB *Escherichia coli* mutants. *Mol Microbiol* 48: 845–854.
- Hansen EB, Athung T, Hansen FG, Skovgaard O, von Meyenburg K (1984) Fine structure genetic map and complementation analysis of mutations in the dnaA gene of *Escherichia coli*. *Mol Gen Genet* 196: 387–396.
- 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.
- Zechiedrich EL, Khodursky AB, Cozzarelli NR (1997) Topoisomerase IV, not gyrase, decatenates products of site-specific recombination in *Escherichia coli*. *Genes Dev* 11: 2580–2592.
- Leibner-Olesen A, Slominska-Wojewodzka M, Hansen FG, Marinus MG (2008) DnaC inactivation in *Escherichia coli* K-12 induces the SOS response and expression of nucleotide biosynthesis genes. *PLoS One* 3(8): e2904.
- Kogoma T (1997) Stable DNA replication: interplay between DNA replication, homologous recombination, and transcription. *Microbiol Mol Biol Rev* 61: 212–38.
- Masai H, Asai T, Kubota Y, Arai K, Kogoma T (1994) *Escherichia coli* PriA protein is essential for inducible and constitutive stable DNA replication. *EMBO J* 13: 5338–45.
- Masai H, Arai K (1988) Operon structure of dnaT and dnaC genes essential for normal and stable DNA replication of *Escherichia coli* chromosome. *J Biol Chem* 263: 15083–93.
- Mallory JB, Alfano C, McMacken R (1990) 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: 13297–13307.
- Zakrzewska-Czerwinska J, Jakimowicz D, Zawilak-Pawlik A, Messer W (2007) Regulation of the initiation of chromosomal replication in bacteria. *FEMS Microbiol Rev* 31: 378–387.
- Singer M, Baker TA, Schützler G, Deischel SM, Goel M, et al. (1989) A collection of strains containing genetically linked alternating antibiotic resistance elements for genetic mapping of *Escherichia coli*. *Microbiol Rev* 53: 1–24.

Acknowledgments

We are thankful to Bénédicte Michel for suggestions, fruitful discussions and for providing strains. We are grateful to Linda Sperling for editing the manuscript and to Lila Ferat for technical assistance. We thank François Michel for his support.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: JLF. Performed the experiments: JLF BS. Analyzed the data: JLF BS. Contributed reagents/materials/analysis tools: JLF BS. Wrote the paper: JLF.

II-3-3) CycC est nécessaire pour redémarrer les fourches dans un mutant *dnaC2*

Après avoir établi que les RF sont réactivables dans un mutant *dnaC2* à température non-permissive, nous nous sommes intéressés à vérifier que la réactivation des RF était compromise dans le double mutant *dnaC2 ΔcycC* (Figure 20). Afin de mesurer la quantité de fourches qui sont réactivées et éviter un effet de la Novobiocine sur l'initiation de la réplication, la drogue a été ajoutée 10 min. après initiation de la réplication- à ce moment il y a plus d'initiation de la réplication des cellules synchronisées (Figure 19). Effectivement, il apparaît que les RF inactivées s'accumulent plus rapidement en réponse à la Novobiocine dans les cellules *ΔcycC dnaC2* que dans les souches *cycC⁺ dnaC2* (Figure 20A). Nous avons vérifié que l'accumulation de RF inactivées dans un mutant *ΔcycC* était directement dépendante de l'allèle *dnaC2* en observant que dans des cellules synchronisées avec DnaA46, celui-ci était identique dans les cellules *cycC⁺* et *ΔcycC*. Nous avons également vérifié que l'accumulation plus rapide des RF inactivées dans un mutant *ΔcycC dnaC2* n'était pas corrélée à une instabilité des RF causée par l'absence de CycC en analysant un mutant *priA2* dans lequel les RF ne sont pas réactivées. L'accumulation des RF inactivées est identique dans des cellules *ΔcycC dnaC2* et dans des cellules *ΔcycC priA2*, ce qui signifie que les cellules *ΔcycC dnaC2* sont incapables de réactiver les RF. Pourtant, il est peu vraisemblable que CycC spécifie une voie alternative de réactivation des RF, puisque la réactivation des RF dans des cellules *dnaA46 (dnaC⁺)* est intégrale et indépendante de CycC (Figure 20B). L'exacte fonction de CycC dans la réactivation des RF reste une question ouverte. Quoiqu'il en soit, il est possible que l'hypersensibilité des cellules *ΔcycC dnaC2* à la Novobiocine reflète la médiocre efficacité de ces cellules à réactiver les RF arrêtées du fait de l'accumulation de SC(+).

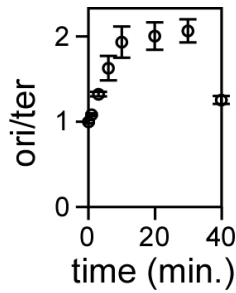


Figure 19 : Évolution du rapport *ori/ter* dans des cellules *dnaC2* synchronisées. Les cellules *dnaC2* synchronisées pendant 90 min. à 40°C ont été incubées à 30°C pendant 6 min. afin de permettre l'initiation de la réplication (t_0 correspond au temps d'initiation de la réplication). L'ADN génomique a été extrait à différents temps après initiation de la réplication, fixe sur une membrane de nylon et hybridé avec une sonde 'ori', puis avec une sonde 'ter' (voir détail dans annexe). Le rapport *ori/ter* est représenté en fonction du temps de prélèvement de l'échantillon après initiation de la réplication.

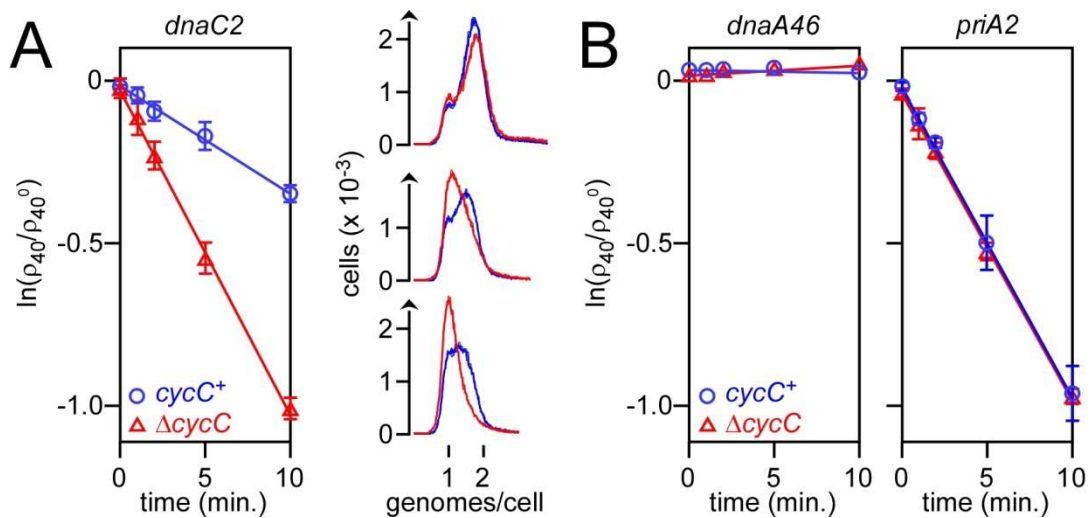


Figure 20 : *cycC* est nécessaire pour redémarrer les fourches dans un mutant *dnaC2*. A – Réactivation des RF dans des cellules *dnaC2 cycC*⁺ et *dnaC2 ΔcycC*. Les cellules *dnaC2* et *dnaC2 ΔcycC* ont été synchronisées au niveau de l'initiation de la réplication. 10 min après initiation de la réplication, la Novobiocine est ajoutée à une concentration qui conduit à l'avortement d'un grand nombre de fourches de réplication (10 μg/ml). Après un temps variable d'incubation des cellules à la Novobiocine dans ces conditions, la concentration de la Novobiocine est baissée à une concentration permissive pour la réplication de 1 μg/ml. Alors, la synthèse d'ADN dépend de la capacité des cellules à réactiver les RF arrêtées (Saifi et Ferat, 2012). Les cellules sont fixées 40min après initiation de la réplication et analysées par cytométrie en flux. Les histogrammes correspondant aux cellules *cycC*⁺ sont en bleu et ceux correspondant aux cellules *ΔcycC* sont en rouge. Le calcul de la quantité de fourches de réplifications redémarrées est présenté dans Saifi and Ferat, 2012. B - Réactivation des RF dans des cellules *cycC*⁺ et *ΔcycC* dans un fond génétique *dnaA46* (gauche) ou *priA2* (droite).

II -4) CycC et l'initiation de la réplication

II-4-1) L'hypersensibilité des cellules $\Delta cycC$ résulte d'un plus grand nombre de collisions des RF dans des adduits ADN::Topoisomérase II

Si l'hypersensibilité d'un mutant $\Delta cycC dnaC2$ à la Novobiocine résulte d'une efficacité médiocre de réinstallation du replisome, il est curieux d'observer que l'hypersensibilité des cellules $\Delta cycC$ à la Norfloxacine est indépendante de l'allèle de *dnaC*. Lorsque la fourche de réplication entre en collision avec les adduits, la dislocation du replisome conduit à la formation d'ADN double brin linéaire qui est pris en charge par le complexe RecBCD et RecA, avant que le replisome soit réinstaller. Dans cette situation également, les cellules $\Delta cycC dnaC2$ devraient être plus sensibles à la Norfloxacine que les cellules isogéniques *dnaC*⁺. Ce n'est pas le cas.

Afin de comprendre ce qui rend les cellules $\Delta cycC$ hypersensibles à la Norfloxacine, nous avons testé la sensibilité d'un mutant $\Delta cycC$ à la Norfloxacine dans différents contextes génétiques et établi que celle-ci était observée dans un contexte $\Delta recA$ (Figure 21), ainsi que dans un contexte $\Delta recB$. Nous concluons de cette série d'expériences que l'hypersensibilité d'un mutant $\Delta cycC$ à la Norfloxacine résulte d'un plus grand nombre de collisions des RF dans les adduits ADN::Topo.

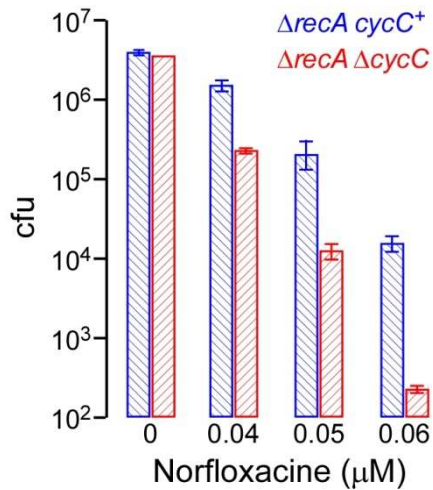


Figure 21 : L'hypersensibilité des cellules $\Delta cycC$ résulte d'un plus grand nombre de collisions des RF dans des adduits ADN::Topo. Les cellules $\Delta recA cycC^+$ et $\Delta recA \Delta cycC$ ont été cultivées sur milieu minimum Glucose jusqu'à être en phase exponentielle de croissance (DO_{550} entre 0,1 et 0,2), puis étalées sur boîtes complétées en Norfloxacin et incubées à 30°C pendant 72 heures. Le nombre de colonies comptées est représenté en fonction de la concentration de Norfloxacin. Les barres d'erreur correspondent à l'écart type autour de la moyenne de trois expériences indépendantes.

II-4-2) L'augmentation du nombre de collisions des RF dans les adduits

ADN::Topoisomérase dans un mutant $\Delta cycC$ n'est pas associée à la surinitiation de la réplication

Comment réconcilier deux faits inconciliables ? La même quantité d'ADN est synthétisée en présence de Norfloxacin dans des cellules $\Delta cycC$ et $cycC^+$ synchronisées (Figure 14) – ce qui signifie implicitement que la fréquence de collision des RF dans les adduits ADN::Topo est identique dans les deux types de cellules – et le fait que les RF entrent en collision plus fréquemment dans des adduits ADN::Topo (Figure 21). Si la fréquence de collision des RF dans les adduits reste constante, ce n'est pas possible. Par contre, si cette fréquence varie, alors, il est possible d'expliquer nos résultats en proposant 1) que la fréquence de la première collision est plus élevée que celle de la deuxième collision, et 2) que CycC est responsable de la baisse de la fréquence de la deuxième collision. Deux hypothèses s'offrent à nous. La première propose que CycC empêche la surinitiation de la réplication. Cette hypothèse est tout à fait concevable puisqu'après collision, RIDA doit logiquement être inactivée. Ainsi, en absence du principal mécanisme de contrôle de l'initiation de la réplication, le rythme des initiations de la réplication pourraient s'accélérer. CycC pourrait dans ces conditions empêcher la surinitiation de la réplication en cas d'inactivation de celle-ci. Alternativement, CycC pourrait contribuer à ralentir la progression des fourches de réplication encore actives après la survenue d'une première collision.

L'allèle $gyrA^{L83}$ est récessif devant l'allèle sensible $gyrA^S$, vraisemblablement parce que la présence d'un seul adduit ADN::Gyrase est suffisant pour inactiver une fourche de réplication (Khodursky and Cozzarelli, 1998). A l'inverse, le fait qu'une combinaison de l'allèle $parC^{K84}$ et $parC^S$ dans la même cellule soit moins sensible aux quinolones que les cellules $parC^S$ a été justifiée par la demi-vie de l'adduit ADN::Topo IV relativement au temps séparant le passage de 2 fourches

de réplication (Khodursky and Cozzarelli, 1998). Cette hypothèse était étayée par l'observation 1) qu'une augmentation du nombre de copies de l'allèle *parC^S* entraînait à nouveau la dominance de l'allèle sauvage sur l'allèle *parC^{K84}* (Khodursky and Cozzarelli, 1998) et 2) que la présence d'une copie de l'allèle *parC^S* était dominante sur l'allèle *parC^{K84}* dans un mutant de surinitiation de la réplication comme $\Delta seqA$ (Khodursky and Cozzarelli, 1998). Dans ce cas de figure particulier, toutefois, nous ne pouvons exclure la possibilité que l'hypersensibilité d'un mutant $\Delta seqA$ à la Norfloxacine résulte en partie de la délocalisation de Topo IV devant la fourche de réplication (Kang S *et al.*, 2003).

L'allèle sensible de *parC* a été cloné dans un plasmide à faible nombre de copie (pACYC, ~10 copies par cellule). Ensuite, les cellules *gyrA^{L83} parC^{K84} cycC⁺* et *gyrA^{L83} parC^{K84} $\Delta cycC$* ont été transformées par le plasmide contenant le gène *parC^S* (ces souches sont génétiquement qualifiées de [1R/10S]). En parallèle, les souches *gyrA^{L83} parC^{K84} cycC⁺* et *gyrA^{L83} parC^{K84} $\Delta cycC$* ont été transformées par le vecteur vide (ces souches sont génétiquement qualifiées [1S/0R]). Dans un contexte *cycC⁺*, les cellules [1R/10S] sont aussi sensibles à la Norfloxacine que les cellules [1S/0R]. Dans un contexte $\Delta seqA$, par contre, les cellules [1R/10S] sont plus sensibles que les cellules [1S/0R] aux quinolones (Khodursky and Cozzarelli, 1998). Nous avons réalisé l'expérience dans un mutant $\Delta cycC$. La sensibilité des cellules $\Delta cycC$ à la Norfloxacine est fortement aggravée lorsque la Topo IV sauvage est surproduite dans la cellule [1R/10S], alors que ce n'est pas le cas dans des cellules *cycC⁺* (Figure 22).

L'hypersensibilité des cellules $\Delta cycC$ lorsqu'une Topo IV sauvage est surproduite dans la cellule est compatible avec une accélération du rythme des initiations de la réplication dans un mutant $\Delta cycC$. Nous nous sommes tournés vers la mesure du rapport entre le nombre de copies de l'origine de réplication et du terminus (*ori/ter*) pour confirmer ce résultat.

L'ADN extrait de cellules en phase exponentielle de croissance est fixé sur filtre de nylon chargé, puis hybridé avec une sonde spécifique à *ter*. Après révélation, la membrane est lavée de cette sonde et enfin réhybridé avec une sonde *ori* (annexe). Dans un fond génétique sauvage, le rapport *ori/ter* dans les cellules $\Delta cycC$ est identique à celui mesuré dans les cellules $cycC^+$. Une observation similaire est faite dans des cellules $dnaC2$, $\Delta recA$ et $\Delta priA$ (Figure 23A). Nous avons également vérifié que la mutation $\Delta acrA$ n'affecte pas le rapport *ori/ter* (Figure 23A).

Nous avons donc étudié le rapport *ori/ter* dans des cellules synchronisées, dans lesquelles la réplication a été arrêtée peu après son initiation. 1 minute après initiation de la réplication, la Norfloxacine a été ajoutée à différentes concentrations et 20 minutes après initiation de la réplication, l'ADN de ces cellules a été extrait. Ces conditions assurent un arrêt rapide de la réplication et l'analyse des ADN extraits avant que la région *ter* ne soit répliquée. Ainsi une surinitiation de la réplication doit être visible dans ces conditions. Des cellules synchronisées avec DnaA46 ou DnaC2 ont été analysées (Figure 23B). Dans les deux conditions de synchronisation analysées, le rapport *ori/ter* demeure identique dans les cellules $\Delta cycC$ et $cycC^+$ (Figure 23B). Nous concluons de cette série d'expérience qu'il y a pas de surinitiation de la réplication dans un mutant $\Delta cycC$.

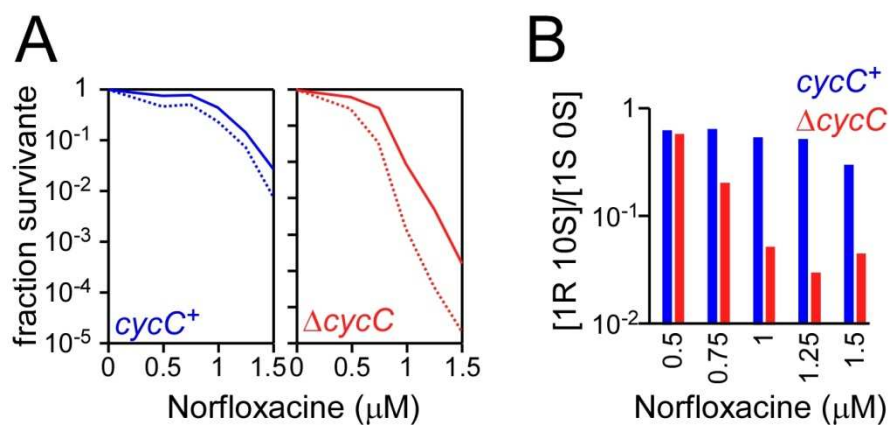


Figure 22 : Hypersensibilité d'un mutant Δ *cycC* en fonction de la quantité de Topo IV. A – Les cellules *cycC*⁺ (bleu) et Δ *cycC* (rouge) transformées avec un plasmide faible nombre de copies contenant le gène *parC*^S (trait plein) ou avec le vecteur vide (pointillé) ont été étalées sur boîtes LB complétées en Norfloxacin. B – Rapport [1R 10S]/[1S 0S] en fonction de la quantité de Norfloxacin.

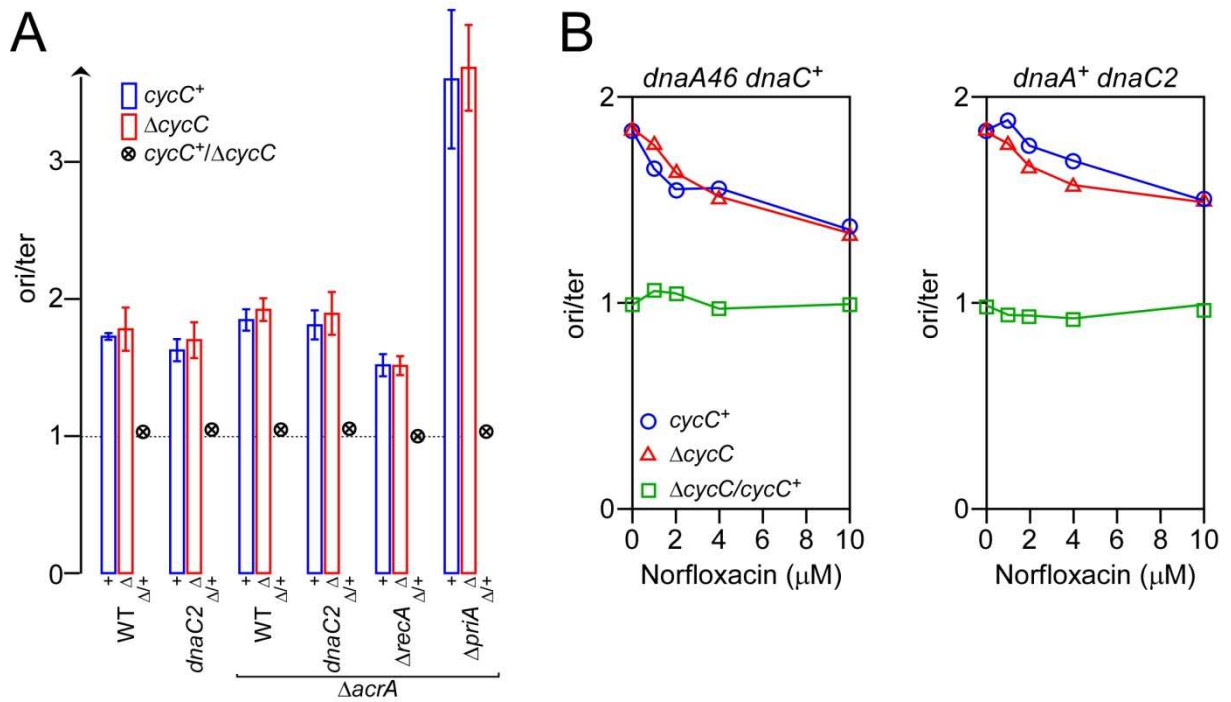


Figure 23 : Il n’y a pas de surinitiation dans un mutant $\Delta cycC$. A – Le rapport *ori/ter* (nombre de copies de l’origine de répllication, *ori*, sur le nombre de copies du terminus, *ter*) a été mesuré dans différent contexte génétique. Les cellules en phase exponentielle de croissance cultivées en milieu minimum-Glucose (de $DO_{550} = 0,01$ à $DO_{550} = 0,1$) ont été lysés pour récupérer l’ADN génomique. L’ADN a été fixé sur membrane de nylon chargée et hybridé avec une sonde *ter* (environ 300 pb à 28,12 min sur le chromosome, annexe), après avoir été déshybridée, la même membrane a été hybridée avec une sonde *ori* (environ 400 pb à 82,44 min, annexe). Finalement, le rapport *ori/ter* a été rapporté à la valeur mesuré de celui-ci à partir d’ADN de cellules en phase stationnaire de croissance. Les barres d’erreur indiquent l’écart type autour de la moyenne d’au moins trois expériences indépendantes. Le rapport entre la valeur *ori/ter* mesurée dans les cellules $cycC^+$ et $\Delta cycC$ est indiqué pour chaque contexte génétique analysé (\otimes). B – Mesure du rapport *ori/ter* dans des cellules $cycC^+$ et $\Delta cycC$ synchronisées avec DnaC2 ou DnaA46. La Norfloxacin a été ajoutée à la concentration indiquée 1 minute après initiation de la répllication. Le rapport *ori/ter* a été mesuré sur des ADN extraits 20 minutes après initiation de la répllication. Le rapport entre ces valeurs mesurées dans les cellules $\Delta cycC$ et dans les cellules $cycC^+$ est présenté en vert.

II-4-3) CycC affect un stade précoce de l'initiation de la réplication

Résumé du manuscrit :

Dans ce manuscrit nous décrivons l'effet associé à la surexpression de CycC pendant l'initiation de la réplication. Nous nous sommes intéressés à l'implication de CycC dans l'initiation de la réplication, car la protéine DnaC est également impliquée dans cette étape de la réplication.

La surexpression de CycC bloque la croissance de mutants d'initiation de la réplication (*dnaA^{ts}* et *dnaC^{ts}*). Après surexpression de CycC nous observons une accumulation de cellules à 1 chromosome, ce qui indique que ni la progression des RF ni la division cellulaire n'est affectée dans ces conditions. La surexpression de CycC n'affecte pas l'initiation de la réplication à *oriC*-indépendante, et la surexpression de CycC n'interfère pas avec la formation du complexe ouvert. Ces résultats nous conduisent à proposer que la surexpression de CycC inhibe spécifiquement l'initiation de la réplication *oriC*-dépendante.

Nous proposons que CycC bloque l'initiation de la réplication après la formation du complexe ouvert, et avant ou pendant le chargement du complexe hélicase répllicative DnaBC.

Identification of *cycC*, a new gene affecting an early step of replication initiation in

Escherichia coli

Boubekeur SAIFI and Jean-Luc FERAT[†]*

CENTRE DE GENETIQUE MOLECULAIRE du CNRS

1 Avenue de la Terrasse

91190 GIF SUR

YVETTE FRANCE

[†] UNIVERSITE DE VERSAILLES SAINT

QUENTIN 45 Avenue des Etats-Unis

78000 Versailles

FRANCE

* Corresponding Author

Tel : (33) 1 69 82 3142

Fax : (33) 1 69 82 4386

Email : ferat@cgm.cnrs-gif.fr

Running title: Implication of *CycC* during replication initiation

Keywords: replication, initiation, *E. coli*, *cycC*

Abbreviation: WT: wild type, cfu: colony forming unit

~ 1 ~

ABSTRACT

At the time of the initiation of replication, the extension of the binding of DnaA at the unique origin of replication of the *E. coli* chromosome, *oriC*, leads to unwinding of the double-stranded DNA, which serves as prelude to loading of the helicase, of the primase and eventually to the formation of the replisome. The initiation of replication is tightly regulated. After initiation, the ATP bound to DnaA is rapidly hydrolyzed, inactivating the initiator protein, through the Regulatory Inactivation of DnaA (RIDA) and *oriC* is sequestered by SeqA. In addition, DnaA is titrated at the newly replicated *datA* sites located minutes away from *oriC*. These mechanisms of regulation of the amount of active DnaA protein in the cell prevent spontaneous and unprogrammed replication initiations and likely ensure that replication is initiated all at once (synchrony) and in coordination with the cell metabolism (timing). Here, we describe a new gene, *cycC*, whose activity affects the progression of the initiation of replication. We found that the overexpression of CycC interferes with the initiation of replication at *oriC* in mutants of the initiator protein, *dnaA*, and of the replicative helicase loader, *dnaC*, but not in mutants of genes involved at a later stage of the initiation of replication. Our results suggest that CycC specifies a new activity implicated at an early stage of the initiation of replication in *E. coli*.

INTRODUCTION

Replication is initiated by the aggregation of DnaA, an AAA+ protein also known as the initiator protein, at R boxes and I sites located within *oriC*, the unique origin of replication of the *E. coli* chromosome (41). DnaA is bound to the R1, R2 and R4 boxes during most of the cell cycle (10), and the extension of its binding to the other R and I sites (including the low affinity sites) located at *oriC* occurs solely at the time of initiation of replication (30). The binding of DnaA to the low affinity sites located at *oriC*, followed by the unwinding of the two strands of DNA in the A/T rich region of *oriC*, occurs after SeqA is chased from the GATC sequestered sites located within and around the I2, I3 and the R5M sites (39) and is facilitated by the recruitment of DiaA at the initiation complex (21, 24). The replicative helicase – DnaB associated with its loader DnaC - is then recruited to the *oriC*::DnaA nucleoprotein complex and loaded onto the DNA (prepriming complex). The primase DnaG is loaded at this stage, chasing DnaC (34), activating DnaB and allowing the synthesis of the primers (priming complex). Finally, the constitution of the DNA polymerase III (the core enzyme and the Clamp) at the primed sites completes the formation of the replisome.

The initiation of replication is tightly controlled in *E. coli*. It occurs once and only once per cycle and it is finely adjusted to the cell metabolism (3, 4). Replication is initiated all at once, independently of the number of origins of replication present in the cell, ensuring the synchrony of the initiation process (5). While DnaA can be associated with ADP or ATP, only the ATP-associated DnaA protein is competent for the initiation of replication (43). After the initiation of replication and upon formation of the replication machinery, the initiator protein is rapidly inactivated by the Regulatory Inactivation of DnaA (RIDA); the Hda protein, activated through an interaction with the beta clamp, stimulates the hydrolysis of the ATP nucleotide bound to the protein into ADP (23, 25). Two other mechanisms, independent

of RIDA, participate in the control of the initiation of replication. The first mechanism involves SeqA and the sequestration of *oriC* by this protein. SeqA binds tightly to hemimethylated GATC sites located at a few R and I sites of *oriC* that are generated after the initiation of replication (39, 45), thus preventing the binding of DnaA at these sites and the formation of a new open complex and therefore the spontaneous reinitiation of unprogrammed replication (33). The second mechanism consists in the titration of DnaA at the newly replicated *datA* sites located minutes away from *oriC* (28).

Among the three mechanisms of control, the one driven by SeqA depends on the Dam methyltransferase (DamMT), the enzyme that catalyzes the post-replicative transfer of a methyl group to the N6 position of the adenosines embedded in GATC sequences throughout the genome (8). The organisms that specify SeqA also specify a DamMT. The distribution of the *dam* gene in the *seqA*-specifying genomes is monophyletic and congruent with that of the 16S rRNA, *i.e.*, in these organisms, the *dam* gene is maintained as a resident gene (6). This observation led us to develop a phylogenetic approach in order to identify other genes that, like *seqA*, were strictly maintained during evolution in those genomes that specify the DamMT (6). This approach, aimed at discovering new genes involved in DNA metabolism (replication, repair, cell cycle coordination, etc.) led to the identification of 18 genes, which were referred to as *dam* resident genes, *dam*^{rdt} (6). Six out the seven genes already characterized are involved in DNA metabolism (*seqA*, *mutH*, *hold*, *mukE*, *mukF* and a protein domain of *mukB*). The other genes identified were of unknown function. Recently, one of them, *matP* has been characterized as a major organizer of the Ter macrodomain (36), enlarging the number of *dam*^{rdt} genes involved in DNA metabolism.

In this work, we studied *cycC* - a hitherto unknown *dam*^{rdt} gene formerly named *yjaG*. We show that the overexpression of CycC specifically increases the thermosensitivity associated with replication initiation mutants (*dnaA* and *dnaC*). We found that the DnaA-

dependent initiation of replication at *oriC* is targeted by CycC and that the inhibiting effect associated with an oversupply of CycC is exerted neither through a modulation of the activity of SeqA nor through that of DiaA. Consistent with an inhibition of the initiation of replication, we show that the proportion of hemimethylated *oriC* in *dnaA46* cells is sharply reduced upon overexpression of CycC. The implication of CycC in an early stage of the initiation of replication is discussed.

MATERIALS AND METHODS

Strains, plasmids, constructions and growth conditions

Strains used in this study derived from CM735 (17). Mutants and Plasmids used in this study are provided in table 1. P1 transduction was used to shuttle alleles between strains and DH5 α was used for routine molecular biology experiments.

Cells were grown in LB (Yeast extract 5 g/l, Bactotryptone 10 g/l, NaCl 5 g/l) or in minimal medium (K₂HPO₄ 10.5 g/l, KH₂PO₄ 4.5 g/l, (NH₄)₂SO₄ 1 g/l, Sodium Citrate 0.5 g/l, complemented with MgSO₄ 1 mM, CaCl₂ 0.1 mM and with Glucose, Glycerol or Alanine (0.2 % w/v) as carbon sources. When required, the following chemicals were added (final concentration): L-Histidine (40 μ g/ml), L-Tryptophane (40 μ g/ml), L-Methionine (40 μ g/ml), thiamine (1 μ g/ml), Ampicilin (100 μ g/ml), Chloramphenicol (30 μ g/ml), Tetracycline (15 μ g/ml), Rifampicin (150 μ g/ml), Cephalexin (10 μ g/ml). Chemicals, antibiotics and amino acids were purchased from SIGMA and the culture reagents from DIFCO.

Cytological analysis

Cells analyzed by flow cytometry were previously fixed by adding 5 volumes of ethanol 70 % per volume of sample. Before analysis, the cells were washed twice in filtered TE [Tris-HCl (pH 7.5) 10mM, EDTA (pH 8) 1 mM], resuspended in TE supplemented with RNase A and Propidium Iodide (10 μ g/ml, each), incubated for 2 hours at 37°C and analyzed. Stained cells were excited at 532 nm with a Green NdYAG solid state laser. The light scattered by individual cells and the fluorescence emitted were detected, and amplified in a PARTEC Particle Analyzing System, PAS III. The forward scatter (FSC) is indicative of the cell mass, and the fluorescence signal emitted and recovered on the FL3 channel (> 650 nm)

was used to quantify the amount of DNA per cell. 100 000 cells were analyzed per run.

Data were analyzed with the Flowmax software version 2.52.

DNA topology

cycC⁺, *cycC* and *hupA* cells, transformed with a pBR322 plasmid, were grown in LB until late exponential phase. Plasmids were extracted with a QIAprep Spin Miniprep kit, resuspended in water and loaded on a 1% agarose gel containing Chloroquine (25 µg/ml, final). The gel was ran for 4 hours at 1.5 V/cm in TEP buffer (Tris-HCL (pH 7.8) 36 mM, NaH₂PO₄ 30 mM, EDTA 1 mM). After the migration, the gel was incubated for 30 minutes in a solution of Ethidium Bromide (1 µg/ml).

DNA purification, DNA digestion, probe synthesis and Southern analysis.

Samples of cells (4 ml) were plunged in a 65°C prewarmed solution of SDS (1.4 %, final) and EDTA (2 mM, final) and further incubated at the same temperature for 6 minutes. DNA were precipitated by cooling the samples on ice for 2 hours after addition of 0.6 volume of pure isopropanol. The samples were spun down, washed twice with ethanol 70 % and dried. The pellets were resuspended overnight in 1 ml of SSC (0.1 X), proteinase K (100 µg/ml) at room temperature. Finally, DNA were extracted twice with phenol, precipitated and resuspended in 20 µl of water.

DNA digestions were performed as recommended by the supplier (NE Biolabs) with RNase 70 µg/ml. After digestion, the samples were precipitated and resuspended in water prior to a 4 h. migration on a 1% agarose gel (3 V/cm).

A sets of primers was designed to amplify the *oriC* region (5' TAATACGACTCACTATAGGGACCGTATAAGCTTG 3' and 5'

GATACACTCTTATCAG 3'), which was then cloned into pGEM-T (ProMEGA). 1 µg of

~ 7 ~

each plasmid, linearized with *Sac* I, was subjected to linear amplification for 10 cycles with Taq DNA polymerase, dATP, dGTP and dCTP 0.2 mM, α P³² dCTP 0.83 mM (3000 Ci/mmol, Amersham Biosciences) and a primer (5'CGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGAC3') that matches specifically a sequence located within the sequence of the vector immediately upstream of the insertion. The resulting amplification products were purified on a G50 Sephadex column.

The transfer on membrane (N⁺-Hybond, Amersham) and the hybridization with probes was performed as described earlier (13, 42). Membranes were analyzed through a Storm 850 phosphorimager (Molecular Dynamics) and analyzed with the program ImageQuant 5.2.

RESULTS

Overexpression of CycC is deleterious in $dnaA^{ts}$ mutants

The dam^{rdt} genes were defined as the genes that were systematically co-maintained through evolution in genomes containing *dam*, the gene that specifies a Dam Methyltransferase (DamMT) involved in DNA metabolism (6) and particularly in the control of the initiation of replication (8). We investigated whether other dam^{rdt} genes were involved in the initiation of replication and expected, if this were the case, that the modulation of their expression, like that of *seqA* (33), would affect the viability of cells specifying a poorly active initiator protein. This investigation led us to isolate *yjaG*, which we renamed *cycC* for cell cycle C.

We first assessed the impact of the overexpression of *CycC* on the thermosensitivity associated with $dnaA^{ts}$ mutant strains. A $dnaA^{+}$ and several $dnaA^{ts}$ strains were transformed with a *CycC*-overexpressing plasmid, pBAD(*cycC*), or with the empty vector, pBAD(-), and plated on a Glycerol medium complemented or not with Arabinose (Figure 1). The overexpression of *CycC* is apparently silent in a $dnaA^{+}$ strain; the viability and shape of the colonies are identical whether the cells were grown in the presence or in the absence of Arabinose. On the other hand, the thermosensitivity of all the pBAD(*cycC*)-transformed $dnaA^{ts}$ mutant strains tested was systematically aggravated when Arabinose was added to the growth medium (Figure 1).

The aggravation of the thermosensitivity associated with the overexpression of *CycC* in $dnaA^{ts}$ mutant strains could result directly from *CycC* targeting of the function of the initiator protein at the initiation step of replication or be an indirect consequence of a synthetic synergy created by oversupply of *CycC* and a poorly active $DnaA^{ts}$ protein. To test these two hypotheses, we analyzed the impact of the overexpression of *CycC* in a cSDR

(constitutive Stable DNA Replication) strain, whose initiation of replication depends neither on *oriC* nor on DnaA (29). For the purpose of this experiment, we analyzed a cSDR strain carrying the thermosensitive allele *dnaA46*. The strain was transformed with pBAD(*cycC*) or with the control vector and plated on minimal Glycerol medium complemented or not with Arabinose. The cSDR *dnaA46* cells transformed with pBAD(-) or with pBAD(*cycC*) cells are fully viable at 30°, 34° and 37°C (data not shown). Hence, the combination of the overexpression of CycC and of a DnaA^{ts} protein is not by itself synthetic lethal at 34°C or at 37°C, which suggests that the deleterious effect associated with an oversupply of CycC in *dnaA^{ts}* strains results from the targeting of the initiation of replication at *oriC*.

Most pBAD(-)-transformed cells were unaffected by the addition of Arabinose (Figure 1). In a few cases, however, the viability of the pBAD(-)-transformed strains was mildly impaired by the addition of Arabinose (*dnaA5*, *dnaA46* and *dnaA602* at 37°C, Figure 1), raising the possibility that the thermosensitivity observed may partly result from the plasmid *per se*. In order to verify that the deleterious effect induced by the overexpression of CycC in *dnaA^{ts}* strains was not conditioned to the presence of the plasmid, we introduced a CycC-overexpressing construction within the chromosome at the *galE* locus (in this construction, the transcription of *cycC* is under the control of the P_{lac} promoter, Table 1). We carried out the experiment in a *dnaA46* background (in which the cfu of the pBAD(-) transformed cells was affected by the addition of Arabinose) and in a *dnaA203* background (in which the cfu of the pBAD(-) transformed cells was not affected by the addition of Arabinose). Consistent with the results of the plasmid assay, the overexpression of CycC from a chromosomal-borne construction was deleterious in the two *dnaA^{ts}* strains tested (Table 2). In a *dnaA46* background, the overexpression of CycC from the P_{lac}-*cycC* construction prevents colony formation at 37°C, but not at 34°C as observed in the plasmid assay. In a *dnaA203*

~ 10 ~

We then verified whether a *cycC* mutation suppressed the thermosensitivity associated with *dnaA*^{ts} mutant strains. *dnaA*^{ts} strains (*dnaA5*, *dnaA46*, *dnaA167*, *dnaA203*, *dnaA508* and *dnaA602*, (17)) carrying either a *cycC*⁺ or a *cycC* allele were grown to exponential phase in LB, serially diluted and spotted on LB plates at 30°, 34°, 37°, 40° and 42°C. Inspection of spots (shape and cfu) revealed that a *cycC* mutation did not affect the thermosensitivity of any of the *dnaA* mutants tested (data not shown, the same results were obtained when the cells were grown on minimal media).

cycC is located upstream of *hupA* (Figure 2A), the gene that specifies the α subunit of the HU protein, which was shown to be involved in the initiation of replication (2, 12, 22, 44). We therefore investigated the possibility that the absence of suppression of the *dnaA*^{ts} phenotype resulted from a deregulation of the expression of *hupA*.

HU restrains negative supercoils (7), which likely explains that the DNA in *hupA* cells is less negatively supercoiled than in WT cells and also that a *hupA* mutant is hypersensitive to Novobiocin, a drug that inhibits type II topoisomerases, among which gyrase (35) (the gyrase eliminates positive supercoils that are generated during the replication and the transcription, and introduces negative supercoils (11)). We extracted plasmid DNA, from *cycC*⁺, *cycC* and *hupA* cells and analyzed the distribution of topoisomers on an agarose gel (Figure 2B). On the one hand, DNA extracted from *hupA* cells is less negatively supercoiled than that extracted from WT cells. On the other hand, plasmids extracted from *cycC*⁺ and *cycC* cells are topologically identical. *cycC*⁺, *cycC* and *hupA* cells were grown on LB until exponential phase and dilutions were plated on LB complemented with Novobiocin, a drug that inhibits the gyrase by targeting its catalytic subunit (14). As reported earlier (35), *hupA* mutant is significantly more sensitive to Novobiocin than WT cells while *cycC*⁺ and *cycC* cells are equally sensitive to Novobiocin (Figure 2C). We also established that a *cycC* mutant was neither asynchronous with respect to the initiation of replication nor

hypersensitive to UV (data not shown), two other phenotypes associated with a deregulation of the expression of HU (2, 22, 31). Altogether, our results strongly suggest that the deletion of *cycC* does not induce polar effects on the expression of *hupA* and therefore that the non-suppression of the thermosensitivity associated with *dnaA*^{ts} mutants does not result from a deregulation of the expression of *hupA*.

Overexpression of CycC during replication initiation

We analyzed whether the overexpression of CycC could be deleterious in other replication mutants. We introduced the P_{lac}-*cycC* construction in a mutant of the replicative helicase (*dnaB107*), a mutant of the helicase loader (*dnaC2*), a mutant of the core polymerase (*dnaE486*) and a mutant of the clamp (*dnaN159*). The resulting strains were plated on minimal Glycerol medium complemented, or not, with IPTG (Table 2). *dnaC2* P_{lac}-*cycC* cells, grown with IPTG at 37°C, formed tiny colonies and the cfu was about 1/10 of that obtained with the same cells grown in absence of IPTG. Similar results were obtained when CycC was overexpressed from the pBAD(*cycC*) construction (data not shown). On the other hand, the overexpression of CycC from the chromosomal P_{lac}-*cycC* construction did not affect the thermosensitivity associated with *dnaB107*, *dnaE486* or *dnaN159* (Table 2).

DnaA has to date been shown to be required exclusively at the initiation stage of replication (37). In contrast, DnaC is needed during the initiation of replication and during the reactivation of aborted replication forks (9, 19). In order to verify whether the deleterious effect induced by the overexpression of CycC in a *dnaC2* background resulted from the activity of DnaC during the initiation of replication, we assayed the overexpression of CycC in a cSDR strain carrying a *dnaC2* allele, since cSDR strains initiate replication through a mechanism similar to that used during the reactivation of aborted replication forks (19). The cSDR *dnaC2* cells were transformed with pBAD(-) or with pBAD(*cycC*) and were plated on

minimal medium supplemented, or not, with Arabinose. In the presence or the absence of Arabinose, the two types of transformed cells were fully viable at 30°C and partially viable at 34°C (the cfu at 34°C was only 1/10 of that observed at 30°C). At 37°C, none of the transformed cells gave rise to colonies (data not shown). Hence, CycC does not affect the thermosensitivity of *dnaC2* in a cSDR background, which indicates that the activity of DnaC2 during the reactivation of aborted replication forks is not targeted by CycC.

Granted that CycC overexpression is deleterious in *dnaA* and *dnaC* mutant cells, but not in mutant cells affected at a later stage of the initiation of replication, we focused our investigation on the first steps of the initiation of replication, *i.e.*, those prior to the loading of the helicase complex DnaBC onto the DNA.

Given the finding that a moderate oversupply of SeqA prevents the initiation of replication in *dnaA46* cells (33), we first asked whether CycC impairs the initiation of replication by modulating the activity or the amount of SeqA specified by the cell. If this were the case, one would expect the overexpression of CycC to be silent in a *seqA dnaA46* double mutant strain. The chromosomal P_{lac} -*cycC* construction was introduced into a *dnaA46 seqA* double mutant and the viability of the resulting strain was assessed after induction of the expression of CycC. P_{lac} -*cycC dnaA46* and P_{lac} -*cycC dnaA46 seqA* cells were fully viable at 30°C, 34°C and 37°C when grown without IPTG. In contrast, when IPTG was added to the growth medium, both strains gave rise to small colonies at 34°C and did not form colonies at 37°C (Table 3). A *seqA* mutation suppresses the thermosensitivity associated with *dnaA46* (33). We introduced a *cycC* mutation into a *dnaA46 seqA* double mutant strain and established that the thermosensitivity of the *cycC seqA dnaA46* triple mutant was identical to that of the *dnaA46 seqA* double mutant (data not shown). Hence, CycC does not exert its deleterious effect in *dnaA46* cells by modulating the activity or the amount of SeqA.

The extension of the binding of DnaA to the low affinity sites at *oriC* is mediated through an interaction between DnaA and DiaA (26); a *diaA* mutation aggravates the thermosensitivity associated with *dnaA46* (21). We verified whether the deleterious effect induced by the overexpression of CycC in *dnaA46* cells resulted from the impairment of the activity of DiaA by CycC. CycC was overexpressed in *diaA dnaA46* cells from the chromosomal $P_{lac-cycC}$ construction. The cells grown on a medium complemented with IPTG led to the formation of small colonies at 30°C and did not produce any colonies at 34°C (Table 4): the overexpression of CycC is even more deleterious in a *dnaA46 diaA* double mutant than in a single *dnaA46* mutant strain. We noted also that the overexpression of CycC was more deleterious in a *diaA dnaC2* double mutant than in a *dnaC2* single mutant. At 37°C, *diaA dnaC2* $P_{lac-cycC}$ cells produced 10 times fewer colonies when grown with IPTG than without (Table 4). Moreover, the introduction of a *cycC* mutation did not affect the viability of *diaA* mutant strains, whether carrying a *dnaA46* or a *dnaC2* mutation (data not shown). Hence, the deleterious effect associated with the overexpression of CycC during the initiation of replication in a *dnaA46* mutant strain is independent of DiaA.

The overexpression of CycC in dnaA46 cells leads to a reduction of the fraction of hemimethylated oriC

oriC becomes hemimethylated after initiation of replication and needs to be remethylated for new rounds of replication to initiate. The methylation status of *oriC* could therefore be diagnostic of the impact of the overexpression of CycC on the initiation of replication. Cultures of $P_{lac-cycC} dnaA^+$ and $P_{lac-cycC} dnaA46$ cells were grown to exponential phase at 37°C. After addition of IPTG to the cultures, samples were collected over a two hour period. A fraction of each sample was fixed for flow cytometry analysis while the other fraction was processed for DNA extraction (Materials and Methods).

~ 14 ~

Flow cytometry analysis of cultures of $P_{lac-cycC}$ *dnaA46* cells revealed that upon induction of CycC expression (+ IPTG), the sample is enriched with cells containing fewer genomes, but those were integral (Figure 3A), which indicates that ongoing replication continues through to completion. The proportion of *dnaA46* cells overexpressing CycC and containing a single chromosome almost doubled after 2 hours of incubation with IPTG, while that of cells with 2 chromosomes remained constant and that of cells with 3 chromosomes decreased by a factor of 2 (Figure 3B), which indicates that under these growth conditions cell division is not blocked. Also, the mass of the *dnaA46* cells overexpressing CycC, whether containing 1, 2 or 3 chromosomes, increased continuously over the time of induction (Figure 3C). In contrast, DNA content and cell mass of uninduced *dnaA46* $P_{lac-cycC}$ cells (- IPTG) (Figure 3A, 3B and 3C), like that of induced and uninduced $dnaA^+$ $P_{lac-cycC}$ cells (Figure 3A), remained constant during the whole experiment.

The DNA of $dnaA^+$ and of *dnaA46* cells overexpressing CycC was analyzed by Southern blot with an *oriC* specific probe (Materials and Methods). We used the assay developed by Campbell and Kleckner to assess the methylation status of *oriC*. The assay is based on the cleavage efficiency at a *Hph* I restriction site that overlaps a sequestered GATC sequence located between the R5M box and the I site at *oriC* (8). When the recognition site for *Hph* I encompasses a methylated adenosine, *i.e.*, is embedded in a GATC sequence, the site is resistant to restriction by *Hph* I. After replication, these sequences are hemimethylated, and half of them become sensitive to restriction. Therefore, the amount of cut DNA at this particular site accounts for half of the amount of hemimethylated *oriC* and is indicative of the rhythm of initiation of replication (8). After addition of IPTG, the fraction of cut DNA at *oriC* in $P_{lac-cycC}$ *dnaA46* cells falls rapidly ; after 30 minutes of induction, the fraction of cut DNA is around 20 % of that at t_0 and it remains so during the two hours of the experiment (Figure 3D). In contrast, the fraction of cut DNA at *oriC* remains almost constant in uninduced

~ 15 ~

dnaA46 P_{lac-cycC} cells and in *dnaA*⁺ P_{lac-cycC} cells, whether the cells were incubated or not with IPTG (Figure 3D).

We measured the amount of initiator protein in *dnaA*⁺ and in *dnaA46* cells overexpressing CycC (+ IPTG) or not (- IPTG) and found no significant difference between these cells (data not shown), which indicates that the sharp reduction of the proportion of hemimethylated *oriC* upon overexpression of CycC does not result from a reduction of the amount of initiator protein in the cell.

DISCUSSION

In this study, we provide information indicating that the overexpression of CycC results in the blockage of the initiation of replication, likely at an early stage of the process. To reach this conclusion, we first ruled out the possibility that the overexpression of CycC was synergistically deleterious with a DnaA^{ts} protein by showing, in a *dnaA46* background, that the overexpression of CycC had no effect when the initiation of replication was not dependent on DnaA or *oriC* (cSDR strains). Second, we established by flow cytometry analysis that DNA synthesis was not blocked in CycC-overexpressing *dnaA46* cells; ongoing replications continued through to completion and cells accumulated integral numbers of genomes. Third, we established that upon overexpression of CycC, the mass of the *dnaA46* cells increased and the proportion of cells with several genomes decreased while that of cells with one genome increased, which indicates that cell division *per se* is not inhibited as a consequence of CycC overexpression. Similar effects were observed when CycC was overexpressed in *dnaA203* cells (data not shown). Fourth, the analysis of the methylation status of a GATC site located between the R5M box and the I1 site at *oriC* revealed that after CycC overexpression the fraction of cells in which this site is hemimethylated dropped quickly to 1/5 of that of cells that do not overexpress CycC. This latter result is consistent with an inhibition of the initiation of replication by CycC. But, since the remethylation of this site is delayed due to its sequestration by SeqA (33), one might argue instead that the reduction of the fraction of cells in which *oriC* is hemimethylated results from a deficit of SeqA. Two reasons, however, led us to rule out this hypothesis. Under such a scenario, the thermosensitivity associated with *dnaA46* should be alleviated (33) and not aggravated, as observed. Also, if the overexpression of CycC resulted in a deficit of SeqA, then the fraction of hemimethylated *oriC* should have been reduced in *dnaA*⁺ cells as well and this was not observed. Fifth, the mildly detrimental effect induced by the overexpression of CycC in a

mutant of the helicase loader (*dnaC*) was shown not to be associated with the activity of DnaC during the reactivation of the replication forks. This strongly suggests that the activity of the replicative helicase loader is targeted by CycC during the initiation of replication. Finally, the overexpression of CycC was shown to be silent in a WT strain, in mutants of the replicative helicase (*dnaB*), of the core polymerase (*dnaE*) and of the clamp (*dnaN*), excluding the implication of CycC after the loading of the helicase.

Granted that both a moderate overexpression of SeqA – the protein that sequesters *oriC* after the initiation of replication – and the lack of DiaA – the protein that facilitates the extension of the binding of DnaA on the R boxes and on the I sites located at *oriC* during the formation of the open complex – impaired the viability of *dnaA46* cells as well (21, 33), one could envision that CycC blocked the initiation of replication by modulating the activity of either of these two proteins. Yet, we ruled out this hypothesis as well, because the overexpression of CycC is epistatic to a *seqA* mutation in a *dnaA46* mutant and also because the overexpression of CycC aggravates the thermosensitivity associated with a *dnaA46 diaA* double mutant.

It is noteworthy that the phenotypes associated with modulation of the expression of *cycC* contrast with those of mutants of other genes whose modulation of expression affects the viability of *dnaA^{ts}* cells. The emblematic *dnaA46* allele specifies a thermolabile initiator protein, whose activity at and above 35°C is severely reduced compared to that of the WT DnaA⁺ protein (20). Hence, the aggravation of the thermosensitivity of *dnaA46* when SeqA is overexpressed and the suppression of the thermosensitivity of *dnaA46* in a *seqA* mutant are both consistent with the function of SeqA as a negative modulator of the initiation of replication (33). It was therefore intriguing to note that despite the deleterious effect associated with the overexpression of CycC in all *dnaA^{ts}* mutants tested, the thermosensitivity of none of these mutants was affected in a *cycC* mutant. In fact, we could not attribute a

single phenotype to a *cycC* mutant. The progression of the cell cycle seems to be unperturbed as well. Moreover, in exponential cultures of *cycC*⁺ and *cycC* cells, grown at 30°C or at 37°C with Alanine (with this carbon source the doubling time is about 180 minutes, which permits the fine grained characterization of each step of the cell cycle) the same proportion of mutant and WT cells were observed to be in the B (prior to replication initiation), in the C (replication of the chromosome) and in the D period (after replication and before cell division) (data not shown).

Hence, the question to be answered is what renders the overexpression of CycC deleterious in replication initiation mutants. We analyzed the sequence of CycC to assess whether the protein could potentially interact with nucleic acids. We found that CycC is strongly acidic (pI 4,45) and that the acidic residues were spread homogeneously along the protein. We took advantage of a crystal structure of the CycC homologous protein of *Shewanella baltica* OS155 (accession PDB: 2Q9R_A) to visualize the positions of the acidic residues and noted that all but one of them were located on the surface of the protein, making an interaction between CycC and DNA very unlikely. Yet, we do not have the data that allow us to exclude this hypothesis. Another open question in regards to CycC is the function specified by the protein during the initiation of replication. At this stage, we envision that CycC could regulate the availability of DnaA during the ordered aggregation of the initiator protein at *oriC* and/or control the recruitment of the helicase complex at the *oriC*::DnaA complex by acting during the transition from the open to the prepriming complex. According to this model, the depletion of CycC could have a minimal effect on the initiation of replication, while an oversupply of CycC could perturb the formation of the open complex and block the initiation of replication. The loophole in this scenario is the absence of phenotype associated with the overexpression of CycC in WT cells. It is possible that the amount of CycC produced under our experimental conditions is not sufficient to affect WT

cells. It is also possible that the inhibitory effect specified by CycC is stimulated in *dnaA* and *dnaC* mutants because the rhythm of the initiations of replication and/or the progression of the cell cycle is already perturbed in these mutant cells. These hypotheses are currently under investigation.

ACKNOWLEDGEMENTS

We are extremely grateful to Olivier Espeli, H el ene Debat and B enedicte Michel for critical reading of the manuscript, suggestions and fruitful discussions. We are grateful to Michele O'Brien, Jim Henle and Linda Sperling for comments and for editing the manuscript. We also wish to thank the referees for their critical comments. This work was supported by grants from Fondation Dina Surdin to BS under aegis of the Fondation de France. We are thankful to B enedicte Michel, Sue Lovett, David Bates and Philippe Bouloc for providing strains and Lila Ferat for technical assistance. Finally, we thank Fran ois Michel for his support. This work was supported by a grant to JLF from IFR115 and by the CNRS.

REFERENCES

1. **Baba, T., T. Ara, M. Hasegawa, Y. Takai, Y. Okumura et al.** 2006. Construction of Escherichia coli K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection. *Mol Syst Biol* 2:1-11
2. **Bahloul, A., F. Boubrik and J. Rouviere-Yaniv.** 2001. Roles of Escherichia coli histone-like protein HU in DNA replication: HU-beta suppresses the thermosensitivity of dnaA46ts. *Biochimie.* 83:219-229.
3. **Boye, E., T. Stokke, N. Kleckner, and K. Skarstad.** 1996. Coordinating DNA replication initiation with cell growth: differential roles for DnaA and SeqA proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93:12206-12211.
4. **Boye, E., A. Løbner-Olesen, and K. Skarstad.** 2000. Limiting DNA replication to once and only once. *EMBO Rep.* 1:479-83.
5. **Boye, E. and A. Løbner-Olesen.** 1990. The role of dam methyltransferase in the control of DNA replication in E. coli. *Cell.* 62:981-9.
6. **Brézellec, P., M. Hoebeke, M. S. Hiet, S. Pasek, and J. L. Ferat.** 2006. DomainSieve: a protein domain-based screen that led to the identification of dam-associated genes with potential link to DNA maintenance. *Bioinformatics.* 22: 1935-1941.
7. **Broyles, S. S. and D. E. Pettijohn.** 1986. Interaction of the Escherichia coli HU protein with DNA. Evidence for formation of nucleosome-like structures with altered DNA helical pitch. *J Mol Biol.* 187:47-60.

8. **Campbell, J. L. and N. Kleckner.** 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.
9. **Carl, P.L.** 1970. *Escherichia coli* mutants with temperature-sensitive synthesis of DNA. *Mol. Gen. Genet* 109:107-122
10. **Cassler, M. R., J. E. Grimwade, , and A.C. Leonard.** 1995. Cell cycle-specific changes in nucleoprotein complexes at a chromosomal replication origin. *EMBO J.* 14:5833-5841.
11. **Champoux, J. J.** 2001. DNA topoisomerases: structure, function, and mechanism. *Annu Rev Biochem.* 70:369-413
12. **Chodavarapu, S., M. M. Felczak, J. R. Yaniv and J. M. Kaguni.** 2007. *Escherichia coli* DnaA interacts with HU in initiation at the *E. coli* replication origin. *Mol Microbiol.* 67:781-92.
13. **Church, G. M. and W. Gilbert.** 1984. Genomic sequencing. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 81: 1991-1995.
14. **Cozzarelli, N. R.** 1980. DNA gyrase and the supercoiling of DNA. *Science.* 207:953-960.
15. **Datsenko, K.A. and B. L. Wanner.** 2000. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97:6640-6645.
16. **Guzman, L. M., D. Belin, M. J. Carson and J. Beckwith.** 1995. Tight regulation, modulation, and high-level expression by vectors containing the arabinose PBAD promoter. *J Bacteriol.* 177:4121-30.

17. **Hansen, E. B., T. Atlung, F. G. Hansen, O. Skovgaard and K. von Meyenburg.** 1984. Fine structure genetic map and complementation analysis of mutations in the *dnaA* gene of *Escherichia coli*. *Mol Gen Genet.* 196: 387-396.
18. **Hansen, F. G. and K. von Meyenburg.** 1979. Characterization of the *dnaA*, *gyrB* and other genes in the *dnaA* region of the *Escherichia coli* chromosome on specialized transducing phages lambda tna. *Mol Gen Genet.* 175:135-144.
19. **Heller, R. C., and K. J. Marians.** 2006. Replisome assembly and the direct restart of stalled replication forks. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 7:932-43.
20. **Hwang, D. S. and J. M. Kaguni.** 1988. Purification and characterization of the *dnaA46* gene product. *J Biol Chem.* 263:10625-10632.
21. **Ishida, T., N. Akimitsu, T. Kashioka, M. Hatano, T. Kubota, Y. Ogata, K. Sekimizu, and T. Katayama.** DiaA, a novel DnaA-binding protein, ensures the timely initiation of *Escherichia coli* chromosome replication. *J Biol Chem.* 279:45546-45555.
22. **Jaffe, A., D. Vinella and R. D'Ari.** 1997. The *Escherichia coli* histone-like protein HU affects DNA initiation, chromosome partitioning via MukB, and cell division via MinCDE. *J Bacteriol.* 179:3494-9.
23. **Katayama. T, T. Kubota, K. Kurokawa, E. Crooke, and K. Sekimizu.** 1998. The initiator function of DnaA protein is negatively regulated by the sliding clamp of the *E. coli* chromosomal replicase. *Cell* 94: 61-71.
24. **Katayama, T., S. Ozaki, K. Keyamura, and K. Fujimitsu.** 2010. Regulation of the replication cycle: conserved and diverse regulatory systems for DnaA and *oriC*. *Nature rev Microb* 8: 163-170
25. **Kato, J. and T. Katayama.** 2001. Hda, a novel DnaA-related protein, regulates the replication cycle in *Escherichia coli*. *EMBO J.* 20:4253-62.

~ 24 ~

26. **Keyamura, K., N. Fujikawa, T. Ishida, S. Ozaki, M. Su'etsugu, K. Fujimitsu, W. Kagawa, S. Yokoyama, H. Kurumizaka, and T. Katayama.** 2007. The interaction of DiaA and DnaA regulates the replication cycle in *E. coli* by directly promoting ATP DnaA-specific initiation complexes. *Genes Dev.* 21:2083-2099.
27. **Khodursky, A.B., B. J. Peter, M. B. Schmid, J. DeRisi, D. Botstein, P. O. Brown and N. R. Cozzarelli.** 2000. Analysis of topoisomerase function in bacterial replication fork movement: use of DNA microarrays. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97:9419-9424.
28. **Kitagawa, R., T. Ozaki, S. Moriya, and T. Ogawa.** 1998. Negative control of replication initiation by a novel chromosomal locus exhibiting exceptional affinity for *Escherichia coli* DnaA protein. *Genes Dev.* 12: 3032-3043.
29. **Kogoma, T.** 1997. Stable DNA replication: interplay between DNA replication, homologous recombination, and transcription. *Microbiol Mol Biol Rev.* 61: 212-238.
30. **Leonard, A. C. and J. E. Grimwade.** 2005. Building a bacterial orisome: emergence of new regulatory features for replication origin unwinding. *Mol Microbiol.* 55:978-985
31. **Li, S. and R. Waters.** 1998. *Escherichia coli* strains lacking protein HU are UV sensitive due to a role for HU in homologous recombination. *J Bacteriol.* 180:3750-3756
32. **Link, A. J., D. Phillips and G. M. Church.** 1997. Methods for Generating Precise Deletions and Insertions in the Genome of Wild-Type *Escherichia coli*: Application to OpenReading Frame Characterization. *J Bact* 179:6228-6237
33. **Lu, M., J. L. Campbell, E. Boye, and N. Kleckner.** 1994. SeqA: a negative modulator of replication initiation in *E. coli*. *Cell.* 77: 413-426.

34. **Makowska-Grzyska, M. and J. M. Kaguni.** 2010. Primase directs the release of DnaC from DnaB. *Mol Cell.* 37: 90-101.
35. **Malik, M., A. Bensaid, J. Rouviere-Yaniv and K. Drlica K.** 1996. Histone -like protein HU and bacterial DNA topology: suppression of an HU deficiency by gyrase mutations. *J Mol Biol.* 256:66-76.
36. **Mercier, R., M. A. Petit, S. Schbath, S. Robin, M. El Karoui, F. Boccard, and O. Espéli.** 2008. Organizing the Ter Macrodomain of the E. coli chromosome. *Cell* 135: 475-485
37. **Messer, W.** 2002. The bacterial replication initiator DnaA. DnaA and *oriC*, the bacterial mode to initiate DNA replication. *FEMS Microbiol. Rev.* 26:355–374.
38. **Nichols, B.P., Shafiq, O. and V. Meiners.** 1998. Sequence analysis of Tn10 insertion sites in a collection of Escherichia coli strains used for genetic mapping and strain construction. *J Bact.* 180:6408-6411.
39. **Nievera, C., J. J. Torgue, J. E. Grimwade, and A. C. Leonard.** 2006. SeqA blocking of DnaA-oriC interactions ensures staged assembly of the E. coli pre-RC. *Mol Cell.* 24:581-592.
40. **Okusu, H., D. Ma and H. Nikaido.** 1996. AcrAB efflux pump plays a major role in the antibiotic resistance phenotype of Escherichia coli multiple-antibiotic-resistance (Mar) mutants. *J Bacteriol.* 178:306-308.
41. **Ozaki, S. and T. Katayama.** 2009. DnaA structure, function, and dynamics in the initiation at the chromosomal origin. *Plasmid.* 62:71-82.
42. **Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis.** 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual, (2nd ed.)*

43. **Sekimizu, K., D. Bramhill and A. Kornberg. 1987.** ATP activates dnaA protein in initiating replication of plasmids bearing the origin of the *E. coli* chromosome. *Cell*. 50(2):259-65.
44. **Skarstad, K., T. A. Baker and A. Kornberg. 1990.** Strand separation required for initiation of replication at the chromosomal origin of *E. coli* is facilitated by a distant RNA--DNA hybrid. *EMBO J.* 9:2341-8.
45. **Slater, S., S. Wold, M. Lu, E. Boye, K. Skarstad, and N. Kleckner. 1995.** *E. coli* SeqA protein binds *oriC* in two different methyl-modulated reactions appropriate to its roles in DNA replication initiation and origin sequestration. *Cell* 82: 927-936.

Table 1 : Strains, plasmids and primers used in this study

Strains	Genotype	reference
AQ12237	<i>oriC209 (ΔR1-4), asnA::Cm rnhA224</i>	D. Bates
BW25113	<i>lacIq rrnBT14 ΔlacZ_{WJ16} hsdR514 ΔaraBADAH33, ΔrhaBADLD78</i>	1
CAG18430	<i>mdoB ::Tn10</i>	38
CM735	<i>metE46, trp3, his4, thi1, galK2, lacY1 or lacZ4, mtl1, ara9, tsx3, ton1, rps8 or rps9, supE44 λ</i>	18
JJC1954	AB1157 <i>dnaE486::Kn</i>	B. Michel
JW3118	BW25113 <i>diaA::Kn</i>	1
JW3963	BW25113 <i>cycC::Kn</i>	1
JW0452	BW25113 <i>acrA ::Kn</i>	1
NK9065	CM735 <i>dnaA5</i>	18
NK9069	CM735 <i>dnaA46</i>	18
NK9073	CM735 <i>dnaA167</i>	18
NK9077	CM735 <i>dnaA203</i>	18
NK9089	CM735 <i>dnaA508</i>	18
NK9091	CM735 <i>dnaA602</i>	18
OHP111	JC7623 <i>hupA ::Cm</i>	J. Rouviere
PC2	<i>leu6 thyA47 dra3 str153 dnaC2 dnaT12</i>	9
STL1845	AB1157 <i>dnaN159 zid3162::Tn10 (Kn)</i>	S. Lovett
STL1270	AB1157 <i>dnaB107 malE::Tn10 (Kn)</i>	S. Lovett
REP524	CM735 <i>hupA ::Cm</i>	This study
REP875	AQ12237 <i>dnaA46</i>	This study
REP877	AQ12237 <i>ΔdnaA</i>	This study
REP1329	CM735 <i>dnaC2 mdoB::Tn10</i>	This study
REP1798	CM735 <i>ΔcycC(KnS)</i>	This study
REP1822	CM735 <i>ΔcycC(KnS) dnaC2 mdoB::Tn10</i>	This study
REP1952	CM735 <i>acrA ::Kn</i>	This study
REP2010	CM735 <i>acrA ::Kn ΔcycC</i>	This study
REP2026	CM735 <i>acrA ::Kn hupA ::Cm</i>	This study
REP2306	CM735 <i>galE::lacI^Q-P_{lac}-cycC</i>	This study
REP2319	CM735 <i>dnaA46 galE::lacI^Q-P_{lac}-cycC</i>	This study
REP2331	CM735 <i>dnaA46^A seqA galE::lacI^Q-P_{lac}-cycC</i>	This study
REP2337	CM735 <i>Δ^{seqA} galE::lacI^Q-P_{lac}-cycC</i>	This study
REP2344	CM735 <i>dnaC2 galE::lacI^Q-P_{lac}-cycC</i>	This study
REP2400	CM735 <i>dnaA203 galE::lacI^Q-P_{lac}-cycC</i>	This study
REP2406	CM735 <i>dnaA46 diaA::Kn galE::lacI^Q-P_{lac}-cycC</i>	This study
REP2409	CM735 <i>diaA::Kn galE::lacI^Q-P_{lac}-cycC</i>	This study
REP2419	CM735 <i>dnaC2 diaA::Kn galE::lacI^Q-P_{lac}-cycC</i>	This study
REP2429	CM735 <i>dnaN159 galE::lacI^Q-P_{lac}-cycC</i>	This study
REP2431	CM735 <i>dnaE486 galE::lacI^Q-P_{lac}-cycC</i>	This study
REP2433	CM735 <i>dnaB107 galE::lacI^Q-P_{lac}-cycC</i>	This study
REP2455	AQ12237 <i>dnaC2 mdoB::Tn10</i>	This study
Plasmids	Description	reference

~ 28 ~

pKO3	Plasmid designed for a 2 steps gene replacement (Cm)	32
pREP525	Introduction of a <i>galE::lacI^Q-P_{lac}-cycC</i> construction within pKO3 (Cm)	This study
pBAD(-)	pBAD18 : pBR derivative plasmid in which the transcription is under the control of the arabinose promoter (Ap)	16
pBAD(cycC)	Introduction of the <i>cycC</i> gene in pBAD18 (Ap)	This study

~ 29 ~

Table 2 : Overexpression of CycC from a chromosomal borne construction in various genetic backgrounds. The strains carrying the $P_{lac-cycC}$ construction at the *galE* locus were grown until exponential phase in minimal Glycerol medium. Serial dilutions of the strains were spotted on minimal Glycerol plates supplemented or not with IPTG (0.5 mM final) and incubated at the indicated temperature. After 48 hours of incubation, the spots were visually inspected. The sizes of the individual colonies formed are noted when the cfu for a given condition was identical to that at 30°C. L: large, M: medium, S: small. The colony size was compared to that of the $dnaA^+$ $P_{lac-cycC}$ strain grown under the same conditions. “-”

indicates that the ratio (cfu at the indicate condition/cfu at 30°C [- IPTG]) was 10^{-4} or less.

	- IPTG			+ IPTG		
	30°C	34°C	37°C	30°C	34°C	37°C
<i>dnaA⁺ galE::P_{lac-cycC}</i>	L	L	L	L	L	L
<i>dnaA46 galE::P_{lac-cycC}</i>	L	L	M	L	S	-
<i>dnaA203 galE::P_{lac-cycC}</i>	L	L	-	-	-	-
<i>dnaC2 galE::P_{lac-cycC}</i>	L	M	M	L	M	0.1
<i>dnaB107 galE::P_{lac-cycC}</i>	L	L	-	L	L	-
<i>dnaN159 galE::P_{lac-cycC}</i>	L	L	-	L	L	-
<i>dnaE486 galE::P_{lac-cycC}</i>	L	L	0.01	L	L	0.01

Table 3. Overexpression of CycC is still deleterious in a *seqA dnaA46* strain. Same legend as in Table 1. The colony size was compared to that of the *dnaA*⁺ P_{lac-cycC} strain grown under the same conditions.

	30°C		34°C		37°C	
	IPTG		-	+	-	+
<i>dnaA</i> ⁺ <i>galE</i> ::P _{lac-cycC}	L	L	L	L	L	L
<i>dnaA46 galE</i> ::P _{lac-cycC}	L	L	L	S	M	-
<i>seqA galE</i> ::P _{lac-cycC}	S	S	M	M	L	L
<u><i>dnaA46 seqA galE</i>::P_{lac-cycC}</u>	<u>L</u>	<u>M</u>	<u>L</u>	<u>S</u>	<u>M</u>	<u>-</u>

Table 4. Overexpression of CycC worsens the phenotypes associated with a *diaA* mutant. Same legend as in Table . The colony size was compared to that of the *diaA*⁺ P_{lac-}*cycC* strain grown under the same conditions.

		30°C		34°C		37°C			
		<i>diaA</i> ⁺		<i>diaA</i>		<i>diaA</i> ⁺		<i>diaA</i>	
IPTG		-	+	-	+	-	+	-	+
	P _{lac-} <i>cycC</i>	L	L	L	L	L	L	L	L
	<i>diaA46</i> P _{lac-} <i>cycC</i>	L	L	L	S	L	S	M	-
	<i>diaC2</i> P _{lac-} <i>cycC</i>	L	L	L	L	L	L	M 0,1	M 0,01

FIGURE CAPTIONS

Figure 1. Overexpression of CycC is deleterious in *dnaA*^{ts} mutant cells. *dnaA*^{ts} mutant strains transformed with pBAD(-) (x) or with pBAD(*cycC*) (○) were grown to exponential phase, serially diluted, spotted on Ampicillin minimal Glycerol plates supplemented (+ ara) or not (- ara) with Arabinose (0.004 %) and incubated at the indicated temperature. After an incubation of 48 hours, the largest dilution giving rise to colonies was identified and plotted against the temperature of incubation.

Figure 2. A *cycC* mutation is not polar on the expression of *hupA*. A – Genomic context of *cycC*. The in-frame deletion of *cycC* is delimited by dashed lines. The sequence on the top represents the junction between the ATG and the last 6 carboxy terminal codons of *cycC*. Scale and genomic position are indicated. B – Migration of pBR322 plasmid DNA, extracted from *cycC*⁺ (WT), *cycC* and *hupA* cells, on an agarose gel complemented with Chloroquine (25 µg/ml). rel.: relaxed DNA, SC(-): negatively supercoiled DNA, di: plasmid dimer. The numbers on the right side indicate the position of the band in kb of the DNA ladder. C – Assessment of the sensitivity to the Novobiocin. *cycC*⁺ (+), *cycC* (Δ) and *hupA* (○) were plated on LB complemented with Novobiocin (abscissa). The assay was performed in a Δ*acrA* background; AcrA is a component of an efflux pump that expels various drugs in the medium, reducing their intracellular concentrations (40). In a Δ*acrA* mutant, the amount of drug required to inhibit Topoisomerases activity is lower than in *acrA*⁺ cells (27). The colonies (cfu) were counted after 48 hours and plotted over the concentration of Novobiocin.

Figure 3. Overexpression of CycC blocks the initiation of the replication at *oriC*.

dnaA⁺ and *dnaA46* cells bearing a chromosomal P_{lac-cycC} construction were grown in minimal Glycerol medium until exponential phase (OD₅₅₀ ~ 0.1) before being complemented with IPTG (500 μM) for 2 hours. Samples were taken at regular time intervals and fixed or processed for DNA extraction (Materials and Methods). A – Cytograms of *dnaA*⁺ (left) and *dnaA46* cells (right) before (0) or after the addition of IPTG (120). Cytograms of mock-induced cells (- IPTG) are also presented. In each cytogram, the number of genomes per cell (FL3) is plotted against the mass (FSC). B – The proportion of *dnaA46* P_{lac-cycC} cells containing 1 (1γ), 2 (2γ), 3 (3γ) genomes is plotted over the time of induction, in the presence of (solid lines), or in the absence of IPTG (dotted lines). Error bars represent the standard deviation around the mean in 5 independent experiments. C – Same as above except that the average mass of cells containing 1 (1γ), 2 (2γ), 3 (3γ) genomes is plotted against the time of induction. Error bars represent the standard deviation around the mean in 5 independent experiments. D – Southern blot of DNA extracted from cultures of *dnaA*⁺ (top, left) and *dnaA46* (top right) cells, incubated with (+) or without (-) IPTG, digested with *Hph* I and hybridized with an *oriC* probe (Materials and Methods). (bottom) The fraction of *Hph* I-cleaved DNA cells is plotted over the time of the experiment. The profile is provided for cells incubated with (solid line) and without IPTG (dotted line). Errors bars indicate the standard deviation around the mean in 3 independent experiments.

Figure 1

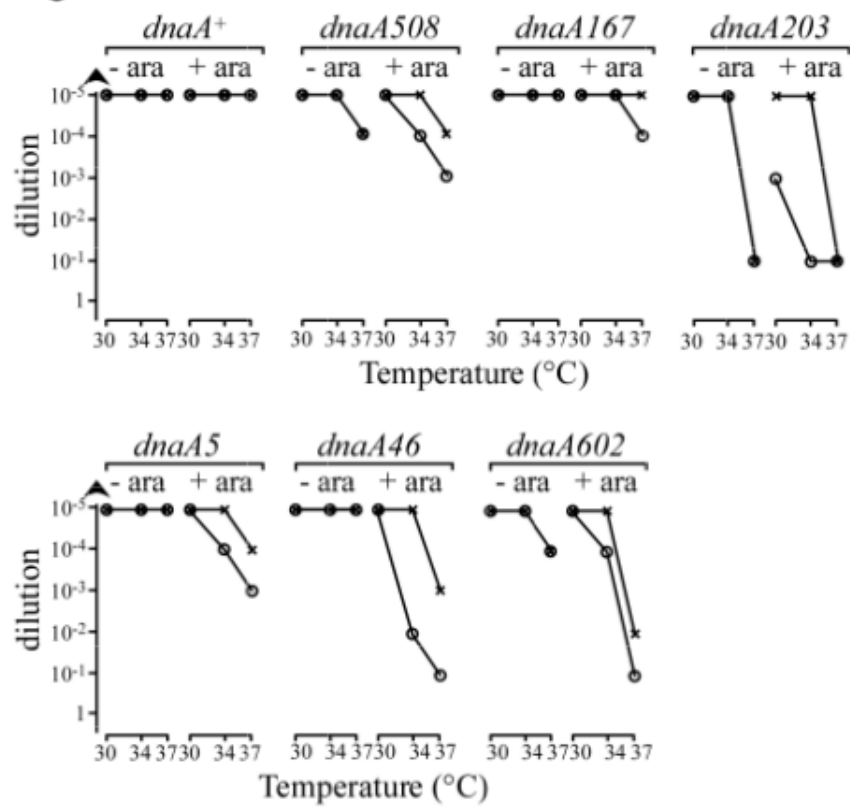


Figure 2

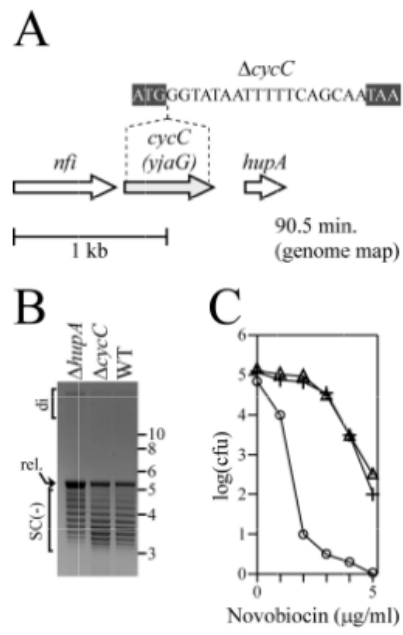
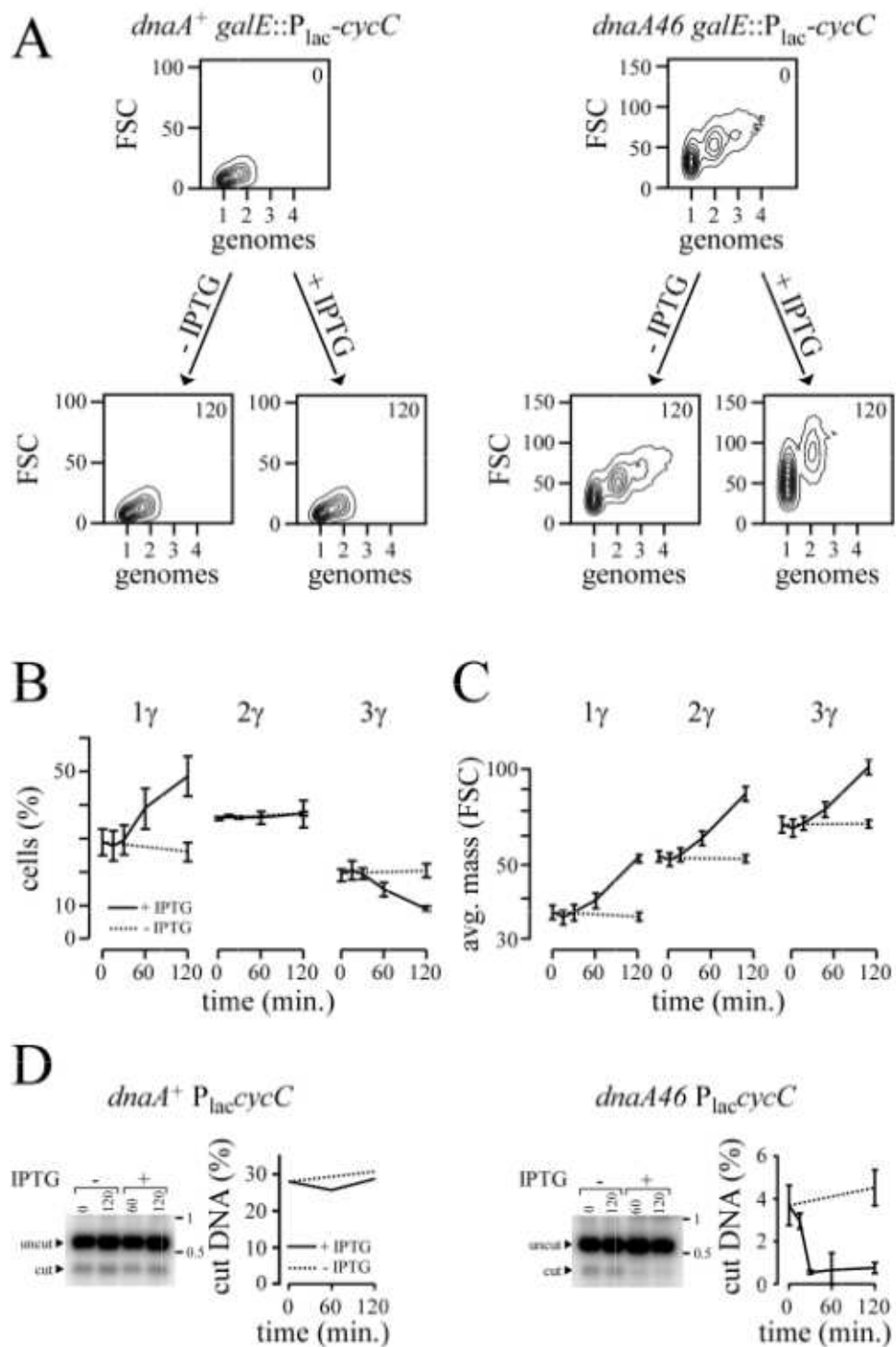


Figure 3



II-4-4) Le complexe ouvert est déstabilisé dans un mutant $\Delta cycC$

La réplication est initiée par l'agrégation de DnaA à *oriC* et par la formation d'un complexe ouvert. Le complexe hélicase répllicative DnaBC est ensuite recruté sur le complexe ouvert, puis chargée sur le brin à réplication discontinue.

Les résultats de la partie précédente suggèrent que la surexpression de CycC affecte l'initiation de la réplication entre l'ouverture de la région *oriC* d'ADN et le chargement du complexe hélicase réplication.

La formation du complexe ouvert est inhibée par la Rifampicine (Figure 24A). Des cellules *dnaC2* incubées à température non-permissive sont bloquées au stade du complexe de pré-amorçage, c'est-à-dire après l'étape sensible à la Rifampicine (Withers and Bernander, 1998) ; la réplication est initiée dès lors que la température est abaissée, y compris après une incubation relativement prolongée des cellules *dnaC2* à température non-permissive en présence de Rifampicine (Figure 24B). Toutefois, l'efficacité de l'initiation décroît avec le temps d'incubation des cellules à température non-permissive en présence de Rifampicine ($k_{WT} = 0,038 \text{ min}^{-1}$). Dans un mutant $\Delta cycC$, la dissociation du complexe de pré-amorçage est plus de deux fois plus rapide ($k_{\Delta cycC} = 0,088 \text{ min}^{-1}$).

Le gène *hupA* est situé directement en aval de *cycC* dans *E. coli*. *hupA* spécifie l'une des deux sous-unités de la protéine HU, une petite protéine basique qui, sous la forme d'un homo- ou d'un hétérodimère, se fixe à l'ADN et restreint des supertours négatifs (Broyles and Pettijohn, 1986). Il a été montré *in vitro* que la libération des supertours négatifs restreints par HU au moment de l'initiation de la réplication favorise l'ouverture d'*oriC* (Hwang and Kornberg, 1992). *In vivo*, la synchronie de l'initiation de la réplication est affectée dans un mutant nul de *hupA* (Bahloul A *et al.*, 2001). Toutefois, aucun résultat clair n'a permis de mettre en évidence directement la fonction

de HupA dans l'initiation de la réplication. Il a également été montré que HU interagit avec DnaA à *oriC* (Chodavarapu *et al.*, 2008). L'expression de HupA ne semble pas être affectée dans un mutant $\Delta cycC$ (Figure 18B). Néanmoins, nous avons vérifié que l'instabilité du complexe ouvert ne résultait pas d'une modulation de l'expression de HupA en mesurant la vitesse de dissociation du complexe ouvert dans un mutant $\Delta hupA$. La dissociation du complexe est plus rapide dans un mutant $\Delta hupA$ ($\kappa_{\Delta hupA} = 0,072 \text{ min}^{-1}$) que dans des cellules isogéniques sauvages, mais sensiblement moins rapide que dans des cellules $\Delta cycC$. Par contre, et à notre grande surprise, le complexe ouvert est stabilisé dans le double mutant $\Delta(cycC-hupA)$ ($\kappa_{\Delta(cycC-hupA)} = 0,028 \text{ min}^{-1}$). L'absence d'effet du double mutant $\Delta(cycC-hupA)$ et des simples mutants $\Delta cycC$ et $\Delta hupA$ sur la thermosensibilité associée à *dnaA46*, nous permet de conclure que la surstabilité du complexe ouvert observée dans les cellules $\Delta(cycC-hupA)$ de même que l'instabilité de ce dernier dans les cellules $\Delta cycC$ et $\Delta hupA$ n'est pas associée à la formation du complexe ouvert, mais plus probablement résulte de la stabilité de celui-ci une fois formé.

La stabilisation du complexe ouvert dans un contexte génétique $\Delta(cycC-hupA)$ ne s'accompagne pourtant d'aucune modification de la thermosensibilité associée à *dnaC2*. Cette dernière n'est d'ailleurs pas directement associée à l'activité de charge de l'hélicase répllicative (Saifi and Ferat, 2012), mais à une fonction supplémentaire – qui reste à identifier – spécifiée par DnaC pendant l'initiation de la réplication. Nous concluons que cette fonction n'est ni affectée par CycC, ni par HupA.

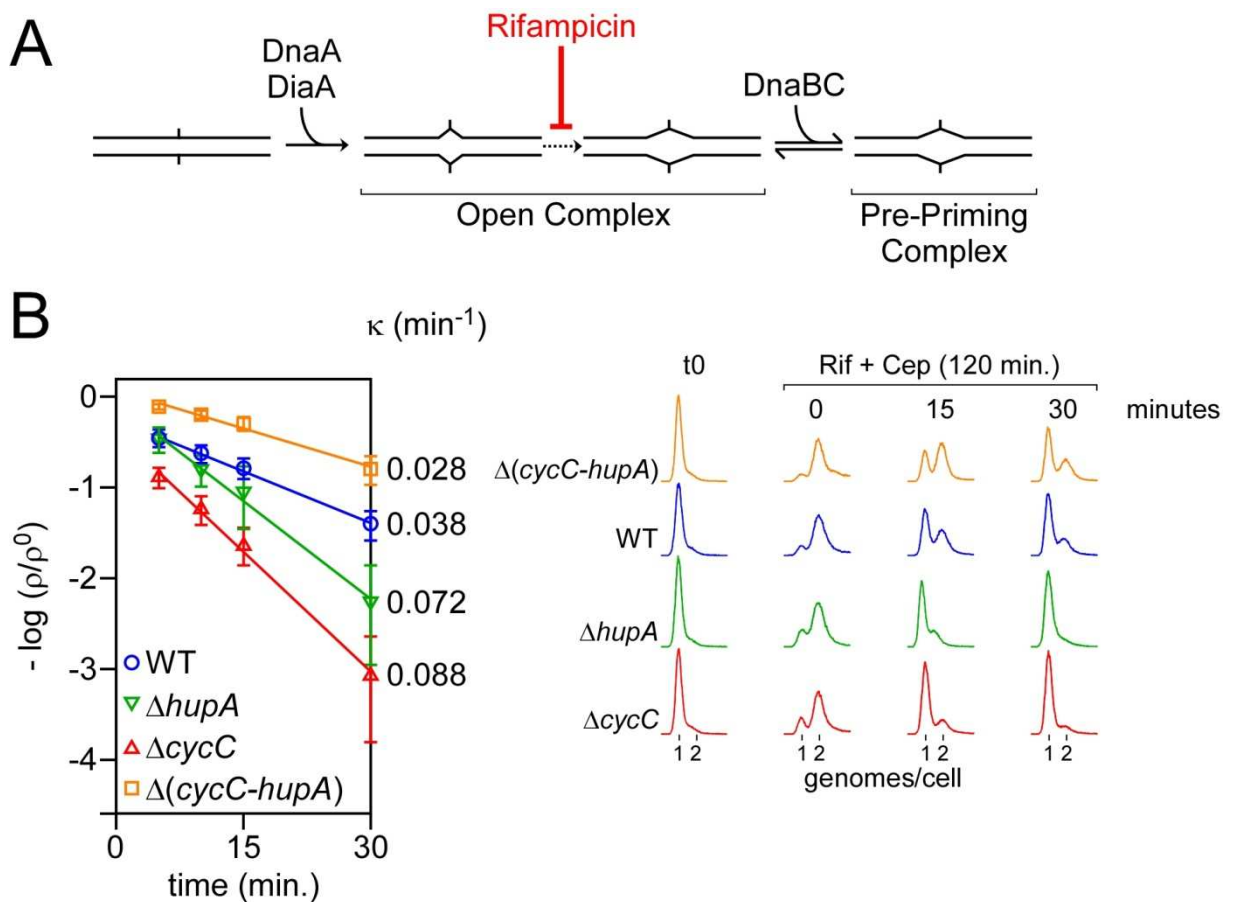


Figure 24: déstabilisation du complexe ouvert dans un mutant $\Delta cycC$. A - Etape ciblée par la Rifampicine entre l'ouverture de la molécule d'ADN du fait de DnaA et de DiaA (Open Complex) et la charge du complexe hélicase réplivative DnaBC (Pre Priming Complex). B – Le taux d'initiation de la réplication dans les cellules $cycC^+ dnaC2$ et $\Delta cycC dnaC2$, $\Delta hupA dnaC2$ et $\Delta cycC \Delta hupA dnaC2$ a été estimé par cytométrie en flux (formule de calcul présenté dans Saifi et Ferat 2012). Les cellules ont été synchronisées à 40°C pendant 90 minutes. La Rifampicine (125 $\mu\text{g/ml}$) et la Céphaléxine (12,5 $\mu\text{g/ml}$) ont été ajoutées à différents temps (5, 10, 15 et 30 min) avant de plonger les cellules à température permissive. Les cellules ont ensuite été incubées pendant 120 min à température permissive et fixées pour être analysées en cytométrie. A droite sont représentés les histogrammes ADN des cellules analysées.

II-5) CycC et HupA forment une cassette génétique

Il est intéressant de noter que la présence de *hupA* en aval de *cycC* est conservée dans les Vibrionales et dans les Pasteurellales (Figure 11B). Il est également intéressant de noter que l'ensemble des protéines HU-A forment une branche monophylétique et que ces protéines sont exclusivement présentes dans les génomes contenant *cycC* (Figure 25A). Pour être plus précis, le gène *hupA* est présent dans les Entérobactériales, les Pasteurellales et les Vibrionales, mais pas dans les Altéromonadales et dans les autres organismes *dam*^{rdt}. Un arbre phylogénétique réalisé à partir d'un alignement des séquences de CycC et de l'ARN 16S indique que la distribution de CycC est convergente avec celle des organismes hôtes. Ce résultat indique que *cycC* est transmis verticalement et que sa présence dans les génomes des organismes *dam*^{rdt} est soumise à pression de sélection ; *cycC* est un gène persistant (Figure 25C et D). La comparaison des arbres phylogénétiques de CycC et du 16S révèle une différence dans la taille des branches à l'intérieur des différents ordres ; les distances génétiques à l'intérieur de l'ordre des Entérobactériales, des Vibrionales et des Pasteurellales semblent comparativement plus courtes que celles mesurées à l'intérieur de l'ordre des Altéromonadales et des Océanospirillales (Figure 25B et 25C). Le rapport de la somme des distances entre les différentes séquences de CycC sur celle mesurée pour les séquences du 16S a été calculé dans chaque ordre et normalisé par rapport à la valeur obtenue dans les Entérobactériales (Figure 25D). Ce rapport est à peu près le même dans les Entérobactériales, les Vibrionales et les Pasteurellales, c'est-à-dire à l'intérieur des espèces contenant le gène *hupA*. A l'inverse, à l'intérieur des espèces ne contenant pas *hupA*, ce rapport est très supérieur à 1, ce qui indique que la pression de sélection appliquée sur *cycC* à l'intérieur des espèces spécifiant *hupA* (les Entérobactériales, les Vibrionales et les Pasteurellales) est nettement plus forte que dans les

organismes ne possédant pas *hupA*. Nos résultats indiquent que *cycC* et *hupA* forment une cassette génétique.

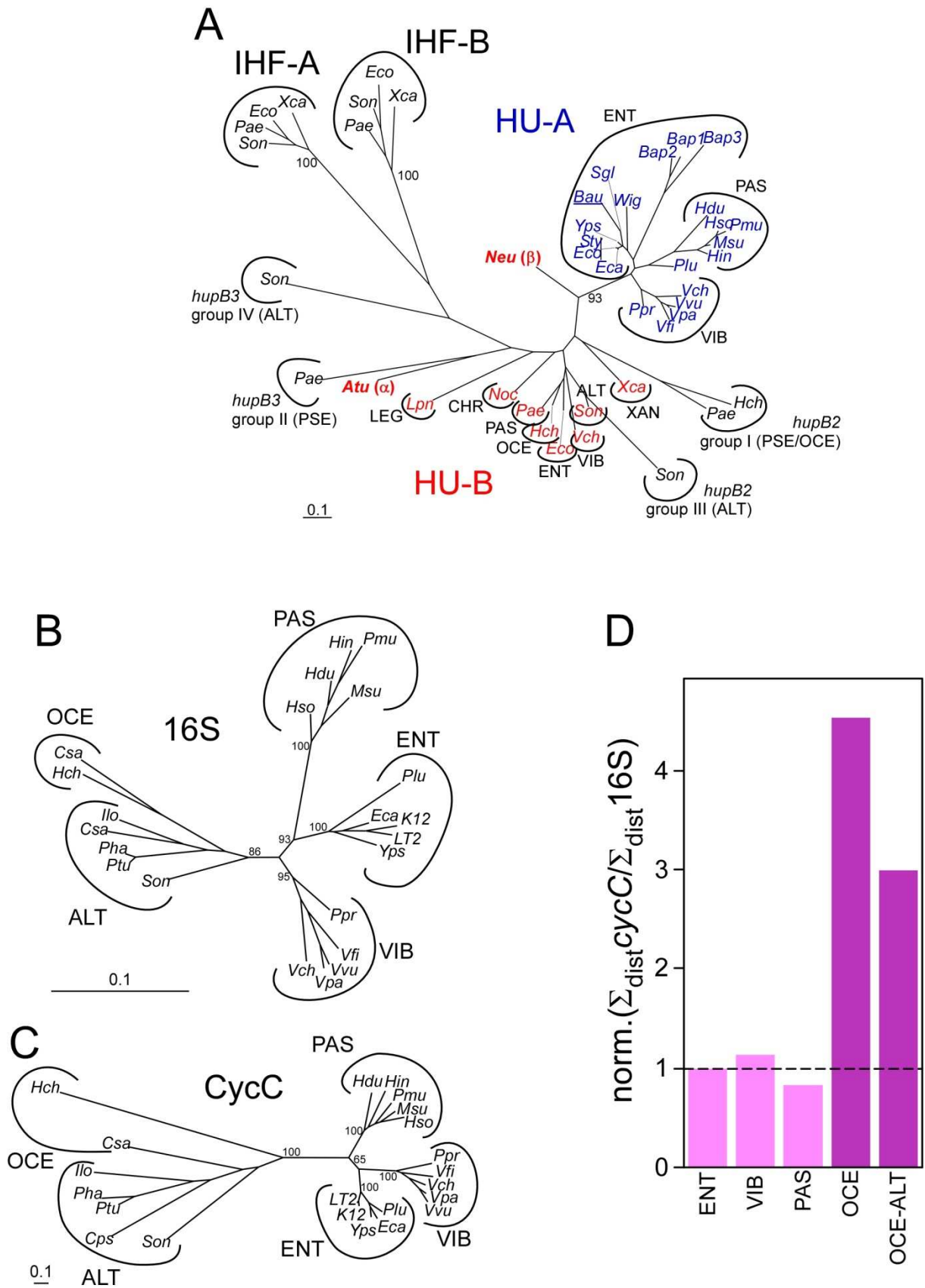


Figure 25 : *cycC* et *hupA* forment une cassette génétique. A – Arbre phylogénétique du domaine Pfam « Bac_DNA_binding » auquel appartiennent les protéines HupA, HupB, IhfA et IhfB des

gammaprotéobactéries. Les séquences Hup d'*Agrobacterium tumefaciens* (alphaprotéobactérie) et de *Nitrosomonas europaea* (bétaprotéobactérie) sont utilisées ici comme « outgroup ». Lorsqu'une branche monophylétique est clairement identifiée, celle-ci est représentée par une espèce emblématique de l'ordre. Plusieurs copies du gène *hup* ont été identifiées dans quelques espèces (essentiellement des Pseudomonadales et des Altéromonadales). Il a été décidé de leur attribuer une désignation *hupB*, lorsque ces séquences étaient clairement enracinées dans la branche correspondant à *hupB* (HU-B) et non à celle de *hupA* (HU-A). Les branches monophylétiques correspondant à IHF-A et IHF-B sont présentées par quelques espèces emblématiques de la classe des gammaprotéobactéries. B – Arbre phylogénétique des Entérobactériales, des Vibionales, des Pasteurellales, des Altéromonadales et des Océanospirillales basée sur la séquence de l'ARN 16S. C – Arbre phylogénétique des Entérobactériales, des Vibionales, des Pasteurellales, des Altéromonadales et des Océanospirillales basée sur la séquence protéique de CycC. D – La somme des distances génétiques entre espèces à l'intérieur d'un ordre a été mesurée pour l'ARN 16S et CycC et le rapport entre la somme des distances CycC/16S a été établi. Les valeurs de ces rapports ont été normalisées par rapport à celle obtenue dans les Entérobactériales. *Bap*, *Buchnera aphidicola* str. APS (*Acyrtosiphon pisum*) ; *Eca*, *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* SCR11043 ; *Eco*, *Escherichia coli* K12 ; *Plu*, *Photorhabdus luminescens* subsp. *laumondii* TTO1 ; *Sty*, *Salmonella typhimurium* LT2 ; *Sgl*, *Sodalis glossinidius* str. 'morsitans' ; *Wgl*, *Wigglesworthia glossinidia* endosymbiont of *Glossina brevipalpis* ; *Yps*, *Yersinia pseudotuberculosis* IP 32953 ; *Aci*, *Acinetobacter* sp. ADP1 ; *Abo*, *Alcanivorax borkumensis* SK2 ; *Aeh*, *Alkalilimnicola ehrlichei* MLHE-1 ; *Bci*, *Baumannia cicadellincola* str. Hc (*Homalodisca coagulata*) ; *Csa*, *Chromohalobacter salexigens* DSM 3043 ; *Cps*, *Colwellia psychrerythraea* 34H ; *Cbu*, *Coxiella burnetii* RSA 493 ; *Ftu*, *Francisella tularensis* subsp. *holarctica* ; *Hch*, *Hahella chejuensis* KCTC 2396 ; *Ilo*, *Idiomarina loihiensis* L2TR ; *Lpn*, *Legionella pneumophila* str. Paris ; *Mca*, *Methylococcus capsulatus* str. Bath ; *Noc*, *Nitrosococcus oceani* ATCC 19707 ; *Pat*, *Pseudoalteromonas atlantica* T6c ; *Par*, *Psychrobacter arcticus* 273-4 ; *Sde*, *Saccharophagus degradans* 2-40 ; *Son*, *Shewanella oneidensis* MR-1 ; *Tcr*, *Thiomicrospira crunogena* XCL-2 ; *Hdu*, *Haemophilus ducreyi* 35000HP ; *Hin*, *Haemophilus influenzae* Rd KW20 ; *Hso*, *Haemophilus somnus* 129PT ; *Msu*, *Mannheimia succiniciproducens* MBEL55E ; *Pmu*, *Pasteurella multocida* subsp. *multocida* str. Pm70 ; *Pae*, *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 ; *Pen*, *Pseudomonas entomophila* L48 ; *Pfl*, *Pseudomonas fluorescens* Pf-5 ; *Ppu*, *Pseudomonas putida* KT2440 ; *Psy*, *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* B728a ; *Ppr*, *Photobacterium profundum* SS9 ; *Vch*, *Vibrio cholerae* O1 biovar *eltor* str. N16961 ; *Vfi*, *Vibrio fischeri* ES114 ; *Vpa*, *Vibrio parahaemolyticus* RIMD 2210633 ; *Vvu*, *Vibrio vulnificus* CMCP6 ; *Xax*, *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* str. 306 ; *Xca*, *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* str. 8004 ; *Xor*, *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* KACC10331 ; *Xfa*, *Xylella fastidiosa* 9a5c. ENT, Entérobactériales ; PAS, Pasteurellales ; VIB, Vibriionales ; PSE, Pseudomonadales ; OCE, Océanospirillales ; ALT, Altéromonadales ; XAN, Xanthomonadales ; CHR, Chromatiales ; LEG, Legionellales. Les différents groupes de gènes *hupB* (de I à IV), notes *hupB2* et *hupB3* font références aux contextes synténiques dans lesquels ces gènes ont été identifiés. Le gène *hupB* sans autre précision est celui situé en aval de l'opéron *tig-clpP-clpX-lon*.

III) Discussion et perspectives

III-1) Discussion

L'hypersensibilité du simple mutant $\Delta cycC$ à la Norfloxaciné et du double mutant $\Delta cycC dnaC2$ à la Novobiocine suggère que CycC participe dans la processivité de la réplication dans *E. coli*. Ces hypersensibilités peuvent résulter : 1) d'une modification de la topologie globale de l'ADN ou de l'activité des Topoisomérases II 2) d'une dérégulation de l'initiation de la réplication dans un mutant $\Delta cycC$ qui conduit à augmenter la fréquence de collision des RF dans les adduits 3) d'une moindre efficacité de réactivation des RF dans un mutant $\Delta cycC$ 4) de la déstabilisation des RF ou d'une combinaison de toutes ces hypothèses.

Ni la topologie de l'ADN, ni l'activité des Topoisomérases II ne sont pas modifiées dans un mutant $\Delta cycC$:

Il était légitime de proposer que l'hypersensibilité des cellules $\Delta cycC$ à la Norfloxaciné et de $dnaC2 \Delta cycC$ à la Novobiocine résulte d'un problème d'activité des Topoisomérases de type II car ces deux antibiotiques ciblent la Gyrase et TopoIV. La Norfloxaciné conduit à la formation de DSB d'ADN. Dans *E coli*, ces DSB peuvent être réparées lorsqu'il y a une copie homologue intacte à proximité de celle qui n'est pas endommagée (Michel *et al.*, 2007). C'est peut être ce qui explique la différence de sensibilité des Topoisomérases de type II ; Topo IV, l'enzyme responsable dans l'élimination des caténanes derrière la RF est moins sensible que la Gyrase à cette drogue. Cependant, nous avons montré que ni l'activité de la Gyrase, ni celle de TopoIV, ni la topologie de l'ADN ne sont affectées dans un mutant $\Delta cycC$.

En conclusion l'hypersensibilité d'un mutant $\Delta cycC$ à la Norfloxaciné ne peut résulter d'une altération de la topologie de l'ADN.

La Norfloxaciné induit la formation d'un plus grand nombre de DSB dans $\Delta cycC$:

L'hypersensibilité du mutant $\Delta cycC$ à la Norfloxaciné est maintenue dans un fond génétique $\Delta recA$ et $\Delta recB$. La persistance de l'hypersensibilité de $\Delta cycC$ à la Norfloxaciné dans des contextes $\Delta recA$ et $\Delta recB$, nous permet de conclure que l'absence de la protéine CycC conduit à l'augmentation de DSB en présence de Norfloxaciné. Cette augmentation de DSB peut résulter d'une augmentation du nombre de RF dans un mutant $\Delta cycC$ - surinitiation de la réplication. En effet, un nombre plus élevé de RF augmente la probabilité de collision d'un RF dans un adduit ADN :: Topoisomérase II. L'augmentation du nombre de collisions résulte-t-elle d'une surinitiation de la réplication?

Pas de surinitiation de la réplication dans un mutant $\Delta cycC$:

Nous avons testé cette hypothèse en vérifiant si un mutant $\Delta cycC$ se comportait phénotypiquement comme un mutant $\Delta seqA$. Pour se faire nous avons surproduit une Topo IV sensible à la Norfloxaciné dans un mutant $\Delta cycC$ et observé que ces cellules étaient, à l'instar des cellules $\Delta seqA$, hypersensible à la Norfloxaciné.

Le rapport *ori/ter* a été mesuré dans les cellules $cycC^+$ et $\Delta cycC$ en absence et en présence de drogue, et dans différents contextes génomiques ($stress^-$ / $stress^+$). Que se soit dans des conditions $stress^-$ ou $stress^+$ le rapport *ori/ter* reste identique entre les cellules $cycC^+$ et $\Delta cycC$. Ce résultat nous conduit à conclure qu'il y a pas de surinitiation de la réplication dans un mutant $\Delta cycC$ en absence ou en présence de stress.

Nous avons conclu de ces expériences que l'hypersensibilité du mutant $\Delta cycC$ à la Norfloxaciné n'est pas le résultat d'une surinitiation de la réplication. Cependant nous ne pouvons pas exclure qu'il

y ait une perte du rythme des initiations de la réplication dans un mutant $\Delta cycC$, avec des temps séparant le passage de deux RF plus courts.

Interaction entre CycC et le complexe hélicase répllicative:

L'étude que nous avons menée sur l'effet de la surexpression de CycC sur l'initiation de la réplication (IR) a révélé que cette protéine bloque IR à *oriC*. Cette surexpression est délétère dans les mutants à faible potentiel d'initiation de la réplication (*dnaA^{ts}* ainsi que dans un mutant *dnaC2*). La surexpression de CycC, par contre, n'affecte pas les cellules qui initient la réplication indépendamment d'*oriC* et de DnaA (cSDR). Lorsque CycC est surexprimé, la progression de la réplication d'ADN n'est pas affectée dans les cellules *dnaA46*, celle-ci conduit à un enrichissement des cellules contenant 1 génome, indiquant également que la division cellulaire n'est pas affectée. L'analyse de l'état de méthylation d'un site GATC situé entre la boîte R5M et I1 à *oriC* révèle qu'après la surexpression de CycC, la fraction hémiméthylé de ce site dans les cellules *dnaA46*, chute rapidement à un niveau basal.

L'absence de l'effet des mutants $\Delta seqA$ et $\Delta diaA$ sur l'inhibition de l'initiation de la réplication associée à la surexpression de CycC, de même que l'absence de la modulation de la thermosensibilité associée à un mutant *dnaA^{ts}* lorsque la protéine CycC est absente, nous ont conduit à rejeter l'hypothèse d'une implication de CycC pendant la formation du complexe ouvert.

La synchronisation des cellules avec DnaC2 bloque les cellules au stade de pré-amorçage. Nous avons montré que les cellules $\Delta cycC dnaC2$ initient moins la réplication par rapport aux cellules *dnaC2* lorsqu'elles sont traitées à la Rifampicine à température non permissive (voir résultat). Ce résultat suggère que CycC pourrait interagir avec le complexe DnaBC et améliore son chargement au niveau de l'ADN. De plus nous avons montré que la double délétion des gènes *cycC* et *hupA* rend l'initiation de la réplication moins sensible à la Rifampicine que les cellules sauvages, ce qui pourrait

confirmer l'existence d'une cassette génétique fonctionnelle entre *cycC* et *hupA*. Cependant, les rôles respectifs de CycC et de HupA dans cette étape restent à déterminer.

La Norfloxaciné conduit à des DSBs, et à la dislocation complète du réplisome et de tous les facteurs annexes (SSB, DnaB, ect). L'inactivation de la RF par la Novobiocine peut permettre à certains éléments du réplisome d'être maintenu sur l'ADN, notamment l'hélicase réplivative DnaB. Cette différence pourrait rendre compte des différences d'hypersensibilité d'un mutant $\Delta cycC$ à la Nofloxaciné et à la Novobiocine.

Nous avons montré qu'une fraction des RF traitées à la Novobiocine redémarrent la réplication dans un mutant *dnaC2* à température non permissive (Saifi and Ferat, 2012), et que cette fraction est dépendante de CycC et de PriA (figure 23), Ces résultats suggèrent que CycC est impliqué dans le redémarrage des RF. Toutefois, le fait qu'un mutant $\Delta cycC$ n'affecte pas le redémarrage des RF dans une cellule *dnaC*⁺ rend cette hypothèse improbable. Nous proposons alternativement, que l'activité du mutant *dnaC2* puisse être compensée par la présence de la protéine CycC.

III-2) Modèle

Le modèle que nous proposons est que CycC ne participe pas dans le redémarrage des fourches de réplication, ni dans le contrôle de l'initiation de la réplication. L'accumulation d'un grand nombre de coupures double brin dans un mutant $\Delta cycC$ en réponse à la Norfloxaciné, ne peut s'expliquer dans ces conditions que par un plus grand nombre de collisions entre la RF avec les adduits par cellule.

Lorsque la fourche de réplication rentre en collision avec un adduit, le réplisome est disloqué intégralement. Nous proposons que CycC spécifie une activité dans la cellule qui conduit à ralentir les fourches de réplication lorsqu'il y a un dommage au niveau de l'ADN.

Chez la levure, la protéine Rad53 est importante pour stabiliser les fourches à l'arrêt, ralentir les RF encore actives et bloquer les initiations tardives de la réplication (Tercero and Diffley, 2001). Les fourches actives sont ralenties afin de diminuer le nombre de collisions des RF actives avec les RF inactivées.

O'donnell et collaborateurs ont montré que les polymérases II et IV, qui interviennent dans la réparation des lésions au niveau de l'ADN et qui sont exprimées aussi lors de la réponse SOS, interagissent avec l'hélicase réplivative et réduisent la vitesse de l'ouverture de la molécule d'ADN, alors que la polymérase réplivative Pol III stimule cette activité (Indiani *et al.*, 2009). Il est proposé qu'en cas de dommage au niveau de l'ADN, la quantité des Pol II et Pol IV augmente dans la cellule et la présence d'une des deux polymérases au niveau du réplisome ralentisse la progression de la fourche de réplication, ceci afin de permettre aux lésions causées sur l'ADN d'être réparées avant l'arrivée d'une nouvelle fourche.

CycC pourrait bien spécifier cette activité de stabilisation des fourches de réplication en ralentissant celles qui sont encore actives.

Il est aussi possible que la protéine CycC interagisse avec le complexe hélicase réplivative. Cette interaction pourrait conduire à un ralentissement de l'activité hélicase spécifiée par DnaB, en cas de dommage de l'ADN. Ce ralentissement conduirait à une réduction de la fréquence de collision et stabiliserait les RF actives sur la molécule d'ADN. Nous proposons un modèle dans lequel CycC spécifie une activité qui maintient la processivité de la réplication tout en ralentissant sa progression.

III-3) Perspective

Si la protéine CycC participe dans la stabilisation des fourches au cours de la réplication en ralentissant leurs vitesses pour éviter qu'elles rentrent en collision, les une avec les autres, il serait intéressant de mesurer la vitesse de réplication dans des mutants $\Delta cycC$ lorsque les fourches de

réplications ont avorté. La prédiction est que les fourches de réplication avancent moins rapidement dans les cellules *cycC*⁺ par rapport aux cellules Δ *cycC*.

Les phénotypes associés à un mutant Δ *cycC* que nous avons obtenus sont observés après avortement des fourches de réplications. Il a été montré que les fourches de réplication peuvent avorter même dans des conditions où la cellule n'est pas stressée, telle que les collisions entre les fourches de réplication et les bulles de transcriptions (De septenville *et al.*, 2012). La protéine CycC intervient-elle dans un cycle normal de croissance ? Si tel est le cas alors, nous pouvons prédire une co-localisation de CycC avec les fourches de réplication dans des conditions normale de croissance.

Il serait intéressant de définir les partenaires de CycC. Cette protéine est très acide, ce qui nous amener à exclure toute interaction directe entre CycC et l'ADN. Toutefois une interaction avec des éléments du réplisome est possible. La protéine CycC interagit-elle directement avec le complexe DnaBC? Une expérience de double hybride devrait répondre à cette question.

Nous avons montré que les gènes *cycC* et *hupA* forment une cassette génétique, et que la délétion des *cycC* ou de *hupA* déstabilise le complexe ouvert. Cependant, le double mutant montre un effet inverse aux simples mutants, la stabilité du complexe ouvert est plus importante dans le double mutant que dans les deux simples mutants. Il serait intéressant de vérifier si ces deux protéines forment aussi une cassette fonctionnelle. Nous n'avons pas pu restaurer le phénotype sauvage de stabilité de l'origine de réplication en exprimant CycC en trans. Si CycC et HupA forment une cassette fonctionnelle, il se pourrait que pour relabir le phénotype sauvage de stabilité du complexe ouvert, il faut exprimer la cassette *cycC* -*hupA* en trans.

Comme ça été cité dans l'introduction la protéine HupA participe dans la formation du complexe ouvert pendant l'initiation de la réplication. Il n'est pas exclu que cette interaction fonctionnelle, soit au niveau de l'initiation de la réplication. Une étude de la stabilité de complexe ouvert en présence et en absence de ces deux protéines devrait nous rendre compte si *cycC* et *hupA* forment une cassette fonctionnelle. Un teste de sensibilité de l'origine de réplication (*oriC*) à la nucléase S1

devrait répondre à la question du rôle fonctionnel de cette cassette CycC-HupA au niveau de l'initiation de la réplication.

VI) Annexes:

1) Analyse par cytométrie

Les cellules sont traitées afin d'être analysés au cytomètre de flux (PASIII, Partec).

Typiquement, 2ml de chaque échantillon sont prélevés et centrifugés à 10000 rpm pendant 5 minutes. Le culot est lavé 2 fois avec 1ml de TE, puis repris dans 200 µl de TE. Les échantillons dont l'ADN doit être analysé sont traités avec une solution de RNase (10 µg/ml) et d'Iodure de propidium (100 µg/ml). Les échantillons sont analysés à raison de 300 à 600 cellules par seconde et 100000 cellules sont comptées. L'Iodure de Propidium est un agent intercalant de l'ADN fluorescent (excitation 535 nm, fluorescence 630 nm). Les profils de cytométrie sont analysés par le logiciel FloMax (version 2.52)

2) Extraction d'ADN, préparation des sonde *ori/ter*, quantification pas southern

Des échantillons de cellules (4 ml) ont été plongés dans une solution SDS (1,4%, final) et de l'EDTA (2 mM, final) préchauffé à 65 ° C et incubé à la même température pendant 6 minutes. Les ADN ont été précipités par le refroidissement sur la glace pendant 2 heures après l'addition de 0,6 volume d'isopropanol pur. Les échantillons ont été centrifugés, lavés deux fois avec de l'éthanol 70% et séchés. Les culots ont été remis en suspension pendant une nuit dans 1 ml de SSC (0,1 X), la protéinase K (100 µg / ml) à température ambiante. Enfin, les ADN ont été extraits en deux temps avec du phénol, précipités et remis en suspension dans 20 µl d'eau. Pour hybridation avec la membrane, l'ADN est dénaturé en le chauffant à 100°C avec une solution de soude 0,4M et EDTA 10mM (finale), puis neutralisé avec acétate de potassium 2M pH7,0. L'ADN est placé dans la glace jusqu'à son transfert sur membrane (N +-Hybond, Amersham). Les échantillons sont déposés sur la membrane et le transfert s'effectue par une aspiration sous vide (Minifold DOT-BLOT). Les

membranes ont été en suite séchées dans un four à 80°C pendant 2h sous vide.

Un couple d'amorces a été conçu pour amplifier la région *oriC* (5' TAATACGACTCACTATAGGGACCGTATAAGCTTG 3' et 5' GATATCACTCTTATCAG 3'), qui a ensuite été cloné dans le plasmide pGEM-T (Promega). La région *ter* a été amplifié pas des amorces (5' CCAACAGAGCTCAAACAGGTAGTAACTATG et 5' TTTCACCTCTAGAAGCGATTATTTATTC 3'), ces amorces correspondent a des séquences qui sont de part et d'autre du gène *yciU*. La séquence *ter* a été clonée dans un plasmide Litmus 29. 1 µg du plasmide contenant *oriC* a été linéarisé par Sac I, et 1 µg plasmide contenant *ter* a été linéarisé par EcoR I-HF. Les deux plasmides ont été soumis à une amplification linéaire pour 10 cycles avec ADN-polymérase Taq, dATP, dGTP et dCTP 0,2 mM, α P³² dCTP 0,83 mm (3000 Ci / mmol, Amersham Biosciences) et une amorce (5' CGCCAGGGTTTTCCAGTCACGAC 3') pour *oriC*, et (5' AGCGGATAACAATTTACACAGGA3') pour la région *ter*, ces amorces correspondent à des séquences spécifique située dans la séquence du vecteur immédiatement en amont de l'insertion. Le produit d'amplification a été purifié sur une colonne Sephadex G50. L'hybridation avec des sondes a été réalisée comme décrit précédemment (Sambrook *et al.*, 1989). Les membranes ont été hybridées avec la sonde *ter* puis analysées par Strom phosphorimager 850 (Molecular Dynamics) et l'ADN a été quantifié avec le programme ImageQuant 5.2. Après révélation de la region *ter*, la membrane subit une dés-hybridation de la sonde *ter* en la plongeant dans du SDS 0,1% en ébullition pendant quelques secondes. La membrane est en suite ré-hybridé de nouveau avec la sonde *ori* et analysée avec ImageQuant 5.2.

3) Étude de la topologie des plasmides

Pour doser la modulation de la topologie de l'ADN due a l'absence de la protéine CycC, nous avons analysé la distribution de topo-isomères d'un dérivé pBR, les pREP150, qui a été introduit dans les souches WT et le Δ *cycC*. Les cellules transformées par pREP150 ont été cultivées sur

milieu LB à 37 °C jusqu'à une DO_{550} de 0,1 avant l'addition de la Novobiocine (0, 2 et 5 $\mu\text{g} / \text{ml}$) et les cellules sont laissées pousser pendant 4 heures avant l'extraction de plasmide (Qiagen miniprep kit). Les plasmides ont été chargés sur un gel d'agarose à 0,9% et fait migré dans un tampon TEP [Tris-HCl (pH 7,8) 36 mM, NaH_2PO_4 30 mM, EDTA 1 mM], complétée avec la chloroquine (20 $\mu\text{g} / \text{ml}$). Le gel a été sous courant pendant 6 heures à 1,5 V / cm. Le gel a été incubé dans le bromure d'éthidium (1 $\mu\text{g} / \text{ml}$ final) pendant 30 min et visualisés sous UV.

V) Références :

A

Abe Y, Jo T, Matsuda Y, Matsunaga C, Katayama T, Ueda T. (2007). Structure and function of DnaA N-terminal domains: specific sites and mechanisms in inter-DnaA interaction and in DnaB helicase loading on oriC. *J Biol Chem.* 282:17816-27.

Adachi S, Hiraga S. (2003). Mutants suppressing novobiocin hypersensitivity of a mukB null mutation. *J Bacteriol.* **185**:3690-5.

Allen GC Jr, Kornberg A. (1991). Fine balance in the regulation of DnaB helicase by DnaC protein in replication in Escherichia coli. *J Biol Chem.* **266**:22096-101.

Arias EE, Walter JC(2006). PCNA functions as a molecular platform to trigger Cdt1 destruction and prevent re-replication. *Nat Cell Biol.* **8**:84-90.

Asai T, Kogoma T(1994). Roles of ruvA, ruvC and recG gene functions in normal and DNA damage-inducible replication of the Escherichia coli chromosome. *Genetics.* **137**:895-902.

B

Bach T, Skarstad K (2004).Re-replication from non-sequesterable origins generates three-nucleoid cells which divideasymmetrically. *Mol Microbiol.* **51**:1589-600.

Bahloul A, Boubrik F, Rouviere-Yaniv J (2001). Roles of Escherichia coli histone-like protein HU in DNA replication: HU-beta suppresses the thermosensitivity of dnaA46ts. *Biochimie.* **83**: 219-29.

Bailey S, Eliason WK, Steitz TA(2007).Structure of hexameric DnaB helicase and its complex with a domain of DnaG primase. *Science.* **318**:459-63.

Bastedo DP, Marczynski GT (2009). CtrA response regulator binding to the Caulobacter chromosome replication origin is required during nutrient and antibiotic stress as well as during cell cycle progression. *Mol Microbiol.* **72**:139-54.

Bell CE (2005). Structure and mechanism of Escherichia coli RecA ATPase. *Mol Microbiol.* **58**:358-66.

Bell SP, Dutta A (2002). DNA replication in eukaryotic cells. *Annu Rev Biochem.* **71**:333-74.

Bernhardt TG, de Boer PA(2005). SImA, a nucleoid-associated, FtsZ binding protein required for blocking septal ring assembly over Chromosomes in E. coli. *Mol Cell.***18**:555-64.

Bi E, Lutkenhaus J. (1993). Cell division inhibitors SulA and MinCD prevent formation of the FtsZ ring. *J Bacteriol.* **175**:1118-25.

Bonilla CY, Melo JA, Toczyski DP. (2008). Colocalization of sensors is sufficient to activate the DNA damage checkpoint in the absence of damage. *Mol Cell.* **30**:267-76.

Bogan JA, Helmstetter CE. (1997). DNA sequestration and transcription in the oriC region of Escherichia coli. *Mol Microbiol.* **26**:889-96.

Boye E, Stokke T, Kleckner N, Skarstad K. (1996). Coordinating DNA replication initiation with cell growth: differential roles for DnaA and SeqA proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **93**:12206-11.

Brézellec P, Hoebeke M, Hiet MS, Pasek S, Ferat JL. (2006). DomainSieve: a protein domain-based screen that led to the identification of dam-associated genes with potential link to DNA maintenance. *Bioinformatics.* **22**:1935-41.

Broyles SS, Pettijohn DE. (1986). Interaction of the Escherichia coli HU protein with DNA. Evidence for formation of nucleosome-like structures with altered DNA helical pitch. *J Mol Biol.* **187**:47-60.

Brown NC, Canellakis ZN, Lundin B, Reichard P, Thelander L. (1969). Ribonucleoside diphosphate reductase. Purification of the two subunits, proteins B1 and B2. *Eur J Biochem.* **9**:561-73.

C

Camara JE, Breier AM, Brendler T, Austin S, Cozzarelli NR, Crooke E. (2005). Hda inactivation of DnaA is the predominant mechanism preventing hyperinitiation of Escherichia coli DNA replication. *EMBO Rep.* **6**:736-41.

Campbell JL, Kleckner N. (1988). The rate of Dam-mediated DNA adenine methylation in Escherichia coli. *Gene.* **74**:189-90.

Campbell JL, Kleckner N. E. (1990). coli oriC and the dnaA gene promoter are sequestered from dam methyltransferase following the passage of the chromosomal replication fork. *Cell.* **62**:967-79.

Cassler MR, Grimwade JE, McGarry KC, Mott RT, Leonard AC. (1999). Drunken-cell footprints: nuclease treatment of ethanol-permeabilized bacteria reveals an initiation-like nucleoprotein complex in stationary phase replication origins. *Nucleic Acids Res.* **27**:4570-6.

Castilla-Llorente V, Muñoz-Espín D, Villar L, Salas M, Meijer WJ. (2006). Spo0A, the key transcriptional regulator for entrance into sporulation, is an inhibitor of DNA replication. *EMBO J.* **25**:3890-9.

Chandler M, Bird RE, Caro L. (1975). The replication time of the Escherichia coli K12 chromosome as a function of cell doubling time. *J Mol Biol.* **94**:127-32.

Chodavarapu S, Felczak MM, Yaniv JR, Kaguni JM. (2008). Escherichia coli DnaA interacts with HU in initiation at the E. coli replication origin. *Mol Microbiol.* **67**:781-92.

Cho E, Ogasawara N, Ishikawa S (2008). The functional analysis of YabA, which interacts with DnaA and regulates initiation of chromosome replication in Bacillus subtilis. *Genes Genet Syst.* **83**:111-25.

Cho H, McManus HR, Dove SL, Bernhardt TG. (2011). Nucleoid occlusion factor SlmA is a DNA-activated FtsZ polymerization antagonist. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **108**:3773-8.

Chopra I, O'Neill AJ, Miller K.(2003). The role of mutators in the emergence of antibiotic-resistant bacteria. *Drug Resist Updat.* **6**:137-45.

Collier J, Shapiro L. (2009). Feedback control of DnaA-mediated replication initiation by replisome-associated HdaA protein in Caulobacter. *J Bacteriol.***191**:5706-16.

D

Dasgupta S, Maisnier-Patin S, Nordström K. (2000). New genes with old modus operandi. The connection between supercoiling and partitioning of DNA in Escherichia coli. *EMBO Rep.* **1**:3237.

DeMassyB, FayetO, KogomaT.(1984)Multiple origin usage for DNA replication in sdrA(rnh) mutants of Escherichia coli K-12. Initiation in the absence of oriC. *J Mol Biol.***178**:227-36.

Den Blaauwen T, Buddelmeijer N, Aarsman ME, Hameete CM, Nanninga N.(1999) . Timing of FtsZ assembly in Escherichia coli. *J Bacteriol.* **181**:5167-75.

De Septenville AL, Duigou S, Boubakri H, Michel B. (2012). Replication fork reversal after replication-transcription collision. *PLoS Genet.* **8**:e1002622.

Duderstadt KE, Mott ML, Crisona NJ, Chuang K, Yang H, Berger JM. (2010). Origin remodeling and opening in bacteria rely on distinct assembly states of the DnaA initiator. *J Biol Chem.* **285**:28229-39

E

Eliasson R, Reichard P. (1978). Primase initiates Okazaki pieces during polyoma DNA synthesis. *Nature.* **272**:184-5.

Espéli O, Borne R, Dupaigne P, Thiel A, Gigant E, Mercier R, Boccard F. (2012). A MatP-divisome interaction coordinates chromosome segregation with cell division in *E. coli*. *EMBO J*. May 11. doi: 10.1038/emboj.2012.128.

Espeli O, Levine C, Hassing H, Marians KJ. (2003). Temporal regulation of topoisomerase IV activity in *E. coli*. *Mol Cell*. **11**:189-201.

Elledge SJ, Zhou Z, Allen JB, Navas TA. (1993). DNA damage and cell cycle regulation of ribonucleotide reductase. *Bioessays*. **15**:333-9.

F

Fang J, Engen JR, Beuning PJ. (2011). Escherichia coli processivity clamp β from DNA polymerase III is dynamic in solution. *Biochemistry*. **50**:5958-68.

Flåtten I, Morigen, Skarstad K (2009). DnaA protein interacts with RNA polymerase and partially protects it from the effect of rifampicin. *Mol Microbiol*. **71**:1018-30.

Foster PL, Trimarchi JM, Maurer RA (1996). Two enzymes, both of which process recombination intermediates, have opposite effects on adaptive mutation in Escherichia coli. *Genetics*. **142**:25-37.

Fujimitsu K, Senriuchi T, Katayama T (2009). Specific genomic sequences of *E. coli* promote replicational initiation by directly reactivating ADP-DnaA. *Genes Dev*. **23**:1221-33.

Fuller RS, Funnell BE, Kornberg A. (1984). The dnaA protein complex with the *E. coli* chromosomal replication origin (oriC) and other DNA sites. *Cell*. **38**:889-900

G

Garcia-Diaz M, Bebenek K (2007). Multiple functions of DNA polymerases. *CRC Crit Rev Plant Sci*. **26**:105-122.

Gellert M, Mizuuchi K, O'Dea MH, Nash HA. (1976). DNA gyrase: an enzyme that introduces superhelical turns into DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **73**:3872-6.

Gille H, Egan JB, Roth A, Messer W. (1991). The FIS protein binds and bends the origin of chromosomal DNA replication, oriC, of Escherichia coli. *Nucleic Acids Res*. **19**:4167-72.

Goranov AI, Breier AM, Merrikh H, Grossman AD (2009). YabA of *Bacillus subtilis* controls DnaA-mediated replication initiation but not the transcriptional response to replication stress. *Mol Microbiol*. **74**:454-66.

Grompone G, Ehrlich SD, Michel B.(2003). Replication restart in gyrB Escherichia coli mutants. *Mol Microbiol.* 48:845-54.

Guarino E, Shepherd ME, Salguero I, Hua H, Deegan RS, Kearsey SE (2011). Cdt1 proteolysis is promoted by dual PIP degrons and is modulated by PCNA ubiquitylation. *Nucleic Acids Res.* **39**:5978-90.

H

Hansen FG (1995). Reinitiation kinetics in eight dnaA(Ts) mutants of Escherichia coli: rifampicin-resistant initiation of chromosome replication. *Mol Microbiol.* **15**:133-40.

Hardy CD, Cozzarelli NR. (2003). Alteration of Escherichia coli topoisomerase IV to novobiocin resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* 47:941-7.

Hansen FG, Atlung T, Braun RE, Wright A, Hughes P, Kohiyama M. (1991). Initiator (DnaA) protein concentration as a function of growth rate in Escherichia coli and Salmonella typhimurium. *J Bacteriol.* **173**:5194-9.

Hayashi M, Ogura Y, Harry EJ, Ogasawara N, Moriya S (2005). Bacillus subtilis YabA is involved in determining the timing and synchrony of replication initiation. *FEMS Microbiol Lett.* **247**:73-9.

Helmstetter CE (1968). Origin and sequence of chromosome replication in Escherichia coli B-r. *J Bacteriol.* **95**:1634-41.

Helmstetter CE, Krajewski CA. (1982). Initiation of chromosome replication in dnaA and dnaC mutants of Escherichia coli B/r F. *J Bacteriol.* 149:685-93.

Heideker J, Lis ET, Romesberg FE (2007). Phosphatases DNA damage checkpoints and checkpoint deactivation. *Cell Cycle.* **6**:3058-64

Hill NS, Kadoya R, Chatteraj DK, Levin PA (2012). Cell size and the initiation of DNA replication in bacteria. *PLoS Genet.* **8**:e1002549.

Hiasa H, Marians KJ (1999). Initiation of bidirectional replication at the chromosomal origin is directed by the interaction between helicase and primase. *J Biol Chem.* **274**:27244-8.

Hiraga S, Ichinose C, Onogi T, Niki H, Yamazoe M. (2000). Bidirectional migration of SeqA-bound hemimethylated DNA clusters and pairing of oriC copies in Escherichia coli. *Genes Cells*. **5**:327-41.

Huisman, O., D'Ari, R., and Gottesman, S. (1984). Cell-division control in Escherichia coli: specific induction of the SOS function SfiA protein is sufficient to block septation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**, 4490-4494

Hu J, McCall CM, Ohta T, Xiong Y (2004). Targeted ubiquitination of CDT1 by the DDB1-CUL4A-ROC1 ligase in response to DNA damage. *Nat Cell Biol*. **6**:1003-9.

Hu Z, Lutkenhaus J. (2001). Topological regulation of cell division in E. coli. spatiotemporal oscillation of MinD requires stimulation of its ATPase by MinE and phospholipid. *Mol Cell*. **7**:1337-43.

Hwang DS, Kornberg A (1992). Opening of the replication origin of Escherichia coli by DnaA protein with protein HU or IHF. *J Biol Chem*. **267**:23083-6.

I

Indiani C, Langston LD, Yurieva O, Goodman MF, O'Donnell M. (2009). Translesion DNA polymerases remodel the replisome and alter the speed of the replicative helicase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **106**:6031-8.

Ishida T, Akimitsu N, Kashioka T, Hatano M, Kubota T, Ogata Y, Sekimizu K, Katayama T. (2004). DiaA, a novel DnaA-binding protein, ensures the timely initiation of Escherichia coli chromosome replication. *J Biol Chem*. **279**:45546-55.

J

Janion C. (2008). Inducible SOS response system of DNA repair and mutagenesis in Escherichia coli. *Int J Biol Sci*. **4**:338-44.

Jones RM, Petermann E (2012). Replication fork dynamics and the DNA damage response. *Biochem J*. **443**:13-26.

K

Kaguni JM (2011). Replication initiation at the Escherichia coli chromosomal origin. *Curr Opin Chem Biol*. **15**:606-13.

Kaguni JM. (2006). DnaA: controlling the initiation of bacterial DNA replication and more. *Annu Rev Microbiol*. **60**:351-75.

Kang S, Han JS, Park JH, Skarstad K, Hwang DS (2003). SeqA protein stimulates the relaxing and decatenating activities of topoisomerase IV. *J Biol Chem.* **278**:48779-85.

Katayama T, Kornberg A (1994). Hyperactive initiation of chromosomal replication in vivo and in vitro by a mutant initiator protein, DnaAcos, of Escherichia coli. *J Biol Chem.* **269**:12698-703.

Katayama T, Ozaki S, Keyamura K, Fujimitsu K (2010). Regulation of the replication cycle: conserved and diverse regulatory systems for DnaA and oriC. *Nat Rev Microbiol.* **8**:163-70.

Keyamura K, Abe Y, Higashi M, Ueda T, Katayama T. (2009). DiaA dynamics are coupled with changes in initial origin complexes leading to helicase loading. *J Biol Chem.* **284**:25038-50.

Kato J, Katayama T. (2001). Hda, a novel DnaA related protein, regulates the replication cycle in Escherichia coli. *EMBO J.* **20**:4253-62.

Kedar GC, Ozcan F, Guzmán EC, Smith DW, Newman VG, Zyskind JW (2000). Role of DNA methylation at GATC sites in the dnaA promoter, dnaAp2. *J Mol Microbiol Biotechnol.* **2**:301-10.

Kelman Z, Yuzhakov A, Andjelkovic J, O'Donnell M (1998). Devoted to the lagging strand-the subunit of DNA polymerase III holoenzyme contacts SSB to promote processive elongation and sliding clamp assembly. *EMBO J.* **17**:2436-49.

Khodursky AB, Cozzarelli NR. (1998). The mechanism of inhibition of topoisomerase IV by quinolone antibacterials. *J Biol Chem.* **273**:27668-77.

Khodursky AB, Peter BJ, Schmid MB, DeRisi J, Botstein D, Brown PO, Cozzarelli NR. (2000). Analysis of topoisomerase function in bacterial replication fork movement: use of DNA microarrays. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **97**:9419-24.

Kim S, Dallmann HG, McHenry CS, Marians KJ (1996). Coupling of a replicative polymerase and helicase: a tau-DnaB interaction mediates rapid replication fork movement. *Cell.* **84**:643-50.

Kim Y, Kipreos ET (2007). The *Caenorhabditis elegans* replication licensing factor CDT-1 is targeted for degradation by the CUL-4/DDB-1 complex. *Mol Cell Biol.* **27**:1394-406.

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**:3032-43.

Kogoma, T. (1978). A novel *Escherichia coli* mutant capable of DNA replication in the absence of protein synthesis. *J. Mol. Biol.* **121**:55–69

Kogoma T (1997). Stable DNA replication: interplay between DNA replication, homologous recombination, and transcription. *Microbiol Mol Biol Rev.* **61**:212-38.

Kogoma T, Lark KG (1970). DNA replication in *Escherichia coli*: replication in absence of protein synthesis after replication inhibition. *J Mol Biol.* **52**:143-64.

Kogoma T, Subia NL, von Meyenburg K. (1985). Function of ribonuclease H in initiation of DNA replication in *Escherichia coli* K-12. *Mol Gen Genet.* **200**:103-9.

Kogoma T, Skarstad K, Boye E, von Meyenburg K, Steen HB (1985). RecA protein acts at the initiation of stable DNA replication in *rnh* mutants of *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol.* **163**:439-44.

Kogoma T, Torrey TA, Connaughton MJ (1979). Induction of UV-resistant DNA replication in *Escherichia coli*: induced stable DNA replication as an SOS function. *Mol Gen Genet.* **176**:1-9.

Kowalczykowski SC. (2000). Initiation of genetic recombination and recombination-dependent replication. *Trends Biochem Sci.* **25**:156-65.

Kubitschek HE.(1974). Estimation of the D period from residual division after exposure of exponential phase bacteria to chloramphenicol. *Mol Gen Genet.* **135**:123-30.

Kuempel PL, Henson JM, Dircks L, Tecklenburg M, Lim DF (1991). *dif*, a *recA*-independent recombination site in the terminus region of the chromosome of *Escherichia coli*. *New Biol.* **3**:799-811.

Kuong KJ, Kuzminov A (2010). Stalled replication fork repair and misrepair during thymineless death in *Escherichia coli*. *Genes Cells.* **15**:619-34.

L

Lark KG, Lark CA. (1979). *recA*-dependent DNA replication in the absence of protein synthesis: characteristics of a dominant lethal replication mutation, *dnaT*, and requirement for *recA*⁺ function. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* **43**:537-49.

Lehman IR, Bessman MJ, Simms ES, Korenberg A (1958). Enzymatic synthesis of deoxyribonucleic acid. I. Preparation of substrates and partial purification of an enzyme from *Escherichia coli*. *J Biol Chem.* **233**:163-70.

Lia G, Michel B, Allemand JF. (2012). Polymerase exchange during Okazaki fragment synthesis observed in living cells. *Science*. **335**:328-31

Li X, Zhao Q, Liao R, Sun P, Wu X. (2003). The SCF(Skp2) ubiquitin ligase complex interacts with the human replication licensing factor Cdt1 and regulates Cdt1 degradation. *J Biol Chem*. **278**:30854-8.

Løbner-Olesen A, Skovgaard O, Marinus MG (2005). Dam methylation: coordinating cellular processes. *Curr Opin Microbiol*. **8**:154-60.

Løbner-Olesen A, Skarstad K, Hansen FG, von Meyenburg K, Boye E (1989). The DnaA protein determines the initiation mass of *Escherichia coli* K-12. *Cell*. **57**:881-9.

Lopper M, Boonsombat R, Sandler SJ, Keck JL. (2007). A hand-off mechanism for primosome assembly in replication restart. *Mol Cell*. **26**:781-93.

Lloyd RG, Sharples GJ (1993). Dissociation of synthetic Holliday junctions by *E. coli* RecG protein. *EMBO J*. **12**:17-22

Lohman TM, Ferrari ME. (1994). *Escherichia coli* single-stranded DNA-binding protein: multiple DNA-binding modes and cooperativities. *Annu Rev Biochem*. **63**:527-70

Leonard AC, Grimwade JE. (2005). Building a bacterial orisome: emergence of new regulatory features for replication origin unwinding. *Mol Microbiol*. **55**:978-85.

Leonard AC, Grimwade JE. (2009). Initiating chromosome replication in *E. coli*: it makes sense to recycle. *Genes Dev*. **23**:1145-50.

Lu AL, Chang DY. (1988). Repair of single base-pair transversion mismatches of *Escherichia coli* in vitro: correction of certain A/G mismatches is independent of dam methylation and host mutHLS gene functions. *Genetics*. **118**:593-600.

Lu M, Campbell JL, Boye E, Kleckner N (1994). SeqA: a negative modulator of replication initiation in *E. coli*. *Cell*. **77**:413-26.

Lee EH, Kornberg A. (1991). Replication deficiencies in priA mutants of Escherichia coli lacking the primosomal replication n' protein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 88:3029-32

M

Mackay V, Linn S (1976). Selective inhibition of the dnase activity of the recBC enzyme by the DNA binding protein from Escherichia coli. *J Biol Chem.* **251**:3716-9.

Makowska-Grzyska M, Kaguni JM (2010). Primase directs the release of DnaC from DnaB. *Mol Cell.* **37**:90-101.

Masek F, Sedliaková M (1992). Inducible stable DNA replication in Escherichia coli uvr+ and uvr- cells, treated with genotoxic chemicals. *Mutat Res.* **281**:63-6.

Masters M.(1970). MOrigin and direction of replication of the chromosome of E. coli B-r. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 65:601-8.

McGlynn P, Al-Deib AA, Liu J, Marians KJ, Lloyd RG. (1997). The DNA replication protein PriA and the recombination protein RecG bind D-loops. *J Mol Biol.* **270**:212-21

McGrath PT, Iniesta AA, Ryan KR, Shapiro L, McAdams HH (2006). A dynamically localized protease complex and a polar specificity factor control a cell cycle master regulator. *Cell.* **124**:535-47.

Michael R.vCassler, Julia E.Grimwade and Alan C.Leonard (1995). Cell cycle-specific changes in nucleoprotein complexes at a chromosomal replication origin. *EMBO Journal* **14**:5833-5841,

Michel B, Boubakri H, Baharoglu Z, LeMasson M, Lestini R.(2007). Recombination proteins and rescue of arrested replication forks. *DNA Repair.* **6**:967-80

Montecucco A, Pedrali-Noy G, Spadari S, Ciarrocchi G. (1988). Multiple roles of DNA ligase at the replication fork. *Biochim Biophys Acta.* **951**:330-4.

Morigen, Molina F, Skarstad K. (2005). Deletion of the datA site does not affect once-per-cell-cycle timing but induces rifampin-resistant replication. *J Bacteriol.* **187**:3913-20.

Morimatsu, K., and Kowalczykowski, S. C. (2003). RecFOR proteins load RecA protein onto gapped DNA to accelerate DNA strand exchange: a universal step of recombinational repair. *Mol Cell* **11**, 1337-134

Mott ML, Erzberger JP, Coons MM, Berger JM.(2008). Structural synergy and molecular crosstalk between bacterial helicase loaders and replication initiators. *Cell.* **135**:623-34

Müller B, Jones C, Kemper B, West SC. (1990). Enzymatic formation and resolution of Holliday junctions in vitro. *Cell*. **60**:329-36.

Murray H, Errington J. (2008). Dynamic control of the DNA replication initiation protein DnaA by Soj/ParA. *Cell*. **135**:74-84.

N

Napolitano R, Janel-Bintz R, Wagner J, Fuchs RP. (2000). All three SOS induction DNA polymerase (Pol II, Pol IV and Pol V) are involved in induced mutagenesis. *EMBO J*. **19**:6259-65

Nievera C, Torgue JJ, Grimwade JE, Leonard AC (2006). SeqA blocking of DnaA-oriC interactions ensures staged assembly of the E. coli pre-RC. *Mol Cell*. **24**:581-92

Noirot-Gros MF, Velten M, Yoshimura M, McGovern S, Morimoto T, Ehrlich SD, Ogasawara N, Polard P, Noirot P (2006). Functional dissection of YabA, a negative regulator of DNA replication initiation in *Bacillus subtilis*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **103**:2368-73.

Nordström K, Dasgupta S (2001). Partitioning of the *Escherichia coli* chromosome: superhelicity and condensation. *Biochimie*. **83**:41-8.

Nurse P, Liu J, Marians KJ.(1999). Two modes of PriA binding to DNA. *J Biol Chem*. **274**:25026-32.

Nurse P, Zavitz KH, Marians KJ (1991). Inactivation of the *Escherichia coli* priA DNA replication protein induces the SOS response. *J Bacteriol*. **173**:6686-93.

O

Odsbu I, Morigen, Skarstad K. (2009). A reduction in ribonucleotide reductase activity slows down the chromosome replication fork but does not change its localization. *PLoS One*. **4**:e7617.

Okusu H, Ma D, Nikaido H. (1996). AcrAB efflux pump plays a major role in the antibiotic resistance phenotype of *Escherichia coli* multiple-antibiotic-resistance (Mar) mutants. *J Bacteriol* **178**: 306–308

P

Paz-Elizur T, Takeshita M, Goodman M, O'Donnell M, Livneh Z. (1996). Mechanism of translesion DNA synthesis by DNA polymerase II. Comparison to DNA polymerases I and III core. *J Biol Chem.* **271**:24662-9.

Peng H, Marians KJ (1993). Decatenation activity of topoisomerase IV during oriC and pBR322 DNA replication in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **90**:8571-5.

Polaczek P. (1990). Bending of the origin of replication of E. coli by binding of IHF at a specific site. *New Biol.* **2**:265-71.

Prescott DM, Kuempel PL. (1972) . Bidirectional replication of the chromosome in Escherichia coli. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **69**:2842-5.

Q

Quon KC, Yang B, Domian IJ, Shapiro L, Marczynski GT (1998). Negative control of bacterial DNA replication by a cell cycle regulatory protein that binds at the chromosome origin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **95**:120-5.

R

Radman, M. (1975). SOS repair hypothesis: phenomenology of an inducible DNA repair which is accompanied by mutagenesis. *Basic Life Sci* **5A**, 355-367

Rajewska M, Wegrzyn K, Konieczny I (2012). AT-rich region and repeated sequences - the essential elements of replication origins of bacterial replicons. *FEMS Microbiol Rev.* **36**:408-34

Raskin DM, de Boer PA. (1999). Rapid pole-to-pole oscillation of a protein required for directing division to the middle of Escherichia coli. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **96**:4971-6.

Reyes-Lamothe R, Sherratt DJ, Leake MC. (2010). Stoichiometry and architecture of active DNA replication machinery in Escherichia coli. *Science.* **328**:498-501.

Roman, L. J., Dixon, D. A., and Kowalczykowski, S. C. (1991). RecBCD-dependent joint molecule formation promoted by the Escherichia coli RecA and SSB proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 3367-3371

Ronen, M., Rosenberg, R., Shraiman, B. I., and Alon, U. (2002). Assigning numbers to the arrows: parameterizing a gene regulation network by using accurate expression kinetics. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 10555-10560

Rosenberg SM, Harris RS, Torkelson J. (1995). Molecular handles on adaptive mutation. *Mol Microbiol.* **18**:185-9.

Rothfield L, Justice S, García-Lara J. (1999). Bacterial cell division. *Annu Rev Genet.* **33**:423-48.

Roychowdhury A, Szymanski MR, Jezewska MJ, Bujalowski W. (2009). Mechanism of NTP hydrolysis by the Escherichia coli primary replicative helicase DnaB protein. 2. Nucleotide and nucleic acid specificities. *Biochemistry.* **48**:6730-46.

Rowen L, Kornberg A. (1978). Primase, the dnaG protein of Escherichia coli. An enzyme which starts DNA chains. *J Biol Chem.* **253**:758-64.

Rowland SL, Fu X, Sayed MA, Zhang Y, Cook WR, Rothfield LI. (2000). Membrane redistribution of the Escherichia coli MinD protein induced by MinE. *J Bacteriol.* **182**:613-9.

Ryan VT, Grimwade JE, Camara JE, Crooke E, Leonard AC. (2004). Escherichia coli prereplication complex assembly is regulated by dynamic interplay among Fis, IHF and DnaA. *Mol Microbiol.* **51**:1347-59.

S

Saifi B, Ferat JL. (2012). Replication fork reactivation in a dnaC2 mutant at non-permissive temperature in Escherichia coli. *PLoS One.* **7**:e33613

Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, (2nd ed.)

Sargentini NJ, Smith KC. (1985). Growth-medium-dependent repair of DNA single-strand and double-strand breaks in X-irradiated Escherichia coli. *Radiat Res.* **104**:109-15

Sargentini NJ, Smith KC. (1992). Involvement of RecB-mediated (but not RecF-mediated) repair of DNA double-strand breaks in the gamma-radiation production of long deletions in Escherichia coli. *Mutat Res.* **265**:83-101.

Savic DJ, Jankovic M, Kostic T. (1990). Cellular role of DNA polymerase I. *J Basic Microbiol.* **30**:769-84.

Schekman R, Weiner A, Kornberg A. (1974). Multienzyme systems of DNA replication *Science.* **186**:987-93.

Sclafani RA, Holzen TM. (2007). Cell cycle regulation of DNA replication. *Annu Rev Genet.* **41**:237-80

Sedliaková M, Slezáriková V, Masek F, Pirsal M. (1995). Inducible stable DNA replication of Escherichia coli tolerates unexcised pyrimidine dimers in an uvr-dependent manner. *Mutat Res.* **346**:9-13.

- Segurado M, Tercero JA. (2009). The S-phase checkpoint: targeting the replication fork. *Biol Cell*. **101**:617-27.
- Sekimizu K, Bramhill D, Kornberg A. (1987). ATP activates dnaA protein in initiating replication of plasmids bearing the origin of the E. coli chromosome. *Cell*. **50**:259-65
- Sekimizu K, Bramhill D, Kornberg A. (1988). Sequential early stages in the in vitro initiation of replication at the origin of the Escherichia coli chromosome. *J Biol Chem*. **263**:7124-30.
- Shibutani ST, de la Cruz AF, Tran V, Turbyfill WJ 3rd, Reis T, Edgar BA, Duronio RJ. (2008) . Intrinsic negative cell cycle regulation provided by PIP box- and Cul4Cdt2-mediated destruction of E2f1 during S phase. *Dev Cell*. **15**:890-900.
- Sinha NK, Snustad DP.(1972). Mechanism of inhibition of deoxyribonucleic acid synthesis in Escherichia coli by hydroxyurea. *J Bacteriol*. **112**:1321-4.
- Simmons LA, Breier AM, Cozzarelli NR, Kaguni JM. (2004).Hyperinitiation of DNA replication in Escherichia coli leads to replication fork collapse and inviability. *Mol Microbiol*. **51**:349-58.
- Skarstad K, Boye E, Steen HB. (1986). Timing of initiation of chromosome replication in individual Escherichia coli cells. *EMBO J*. **5**:1711-7.
- Skarstad K, Wold S. (1995). The speed of the Escherichia coli fork in vivo depends on the DnaB:DnaC ratio. *Mol Microbiol*. **17**:825-31
- Spies M, Bianco PR, Dillingham MS, Handa N, Baskin RJ, Kowalczykowski SC. (2003). A molecular throttle: the recombination hotspot chi controls DNA translocation by the RecBCD helicase. *Cell*. **114**:647-54.
- Spies M, Dillingham MS, Kowalczykowski SC. (2005). Translocation by the RecB motor is an absolute requirement for {chi}-recognition and RecA protein loading by RecBCD enzyme. *J Biol Chem*. **280**:37078-87.
- Steiner WW, Kuempel PL. (1998). Sister chromatid exchange frequencies in Escherichia coli analyzed by recombination at the dif resolvase site. *J Bacteriol*. **180**:6269-75.
- Stukenberg PT, Turner J, O'Donnell M. (1994). An explanation for lagging strand replication: polymerase hopping among DNA sliding clamps. *Cell*. **78**:877-87.
- 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**:6528-36.
- Sutherland JH, Tse-Dinh YC. (2010). Analysis of RuvABC and RecG involvement in the escherichia coli response to the covalent topoisomerase-DNA complex. *J Bacteriol*. **192**:4445-51.

T

Tercero JA, Diffley JF. (2001). Regulation of DNA replication fork progression through damaged DNA by the Mec1/Rad53 checkpoint. *Nature*. **412**:553-7

Tonthat NK, Arold ST, Pickering BF, Van Dyke MW, Liang S, Lu Y, Beuria TK, Margolin W, Schumacher MA. (2011). Molecular mechanism by which the nucleoid occlusion factor, SlmA, keeps cytokinesis in check. *EMBO J*. **30**:154-64.

Tougu K, Marians KJ. (1996). The interaction between helicase and primase sets the replication fork clock. *J Biol Chem*. **271**:21398-405.

Tsuchihashi Z, Kornberg A. (1990). Translational frameshifting generates the gamma subunit of DNA polymerase III holoenzyme. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **87**:2516-20.

V

Valens M, Penaud S, Rossignol M, Cornet F, Boccard F. (2004). Macrodomain organization of the Escherichia coli chromosome. *EMBO J*. **23**:4330-41.

Von Meyenburg K, Boye E, Skarstad K, Koppes L, Kogoma T. (1987). Mode of initiation of constitutive stable DNA replication in RNase H-defective mutants of Escherichia coli K-12. *J Bacteriol*. **169**:2650-8.

von Freiesleben U, Rasmussen KV, Schaechter M. (1994). SeqA limits DnaA activity in replication from oriC in Escherichia coli. *Mol Microbiol*. **14**:763-72.

Von Freiesleben U, Rasmussen KV, Atlung T, Hansen FG. (2000). Rifampicin-resistant initiation of chromosome replication from oriC in ihf mutants. *Mol Microbiol*. **37**:1087-93.

W

Wahle E, Lasken RS, Kornberg A. (1989). The dnaB-dnaC replication protein complex of Escherichia coli. I. Formation and properties. *J Biol Chem*. **264**:2463-8.

Weitao T, Nordström K, Dasgupta S. (2000). Escherichia coli cell cycle control genes affect chromosome superhelicity. *EMBO Rep*. **1**:494-9.

Weitao T, Nordström K, Dasgupta S. (1999). Mutual suppression of mukB and seqA phenotypes might arise from their opposing influences on the Escherichia coli nucleoid structure. *Mol Microbiol*. **34**:157-68.

Withers HL, Bernander R. (1998). Characterization of dnaC2 and dnaC28 mutants by flow cytometry. *J Bacteriol.* 180:1624-31.

X

Xiao H, Dong Z, O'Donnell M. (1993). DNA polymerase III accessory proteins. IV. Characterization of chi and psi. *J Biol Chem.* **268**:11779-84.

Y

Yeeles JT, Marians KJ. (2011). The Escherichia coli replisome is inherently DNA damage tolerant. *Science.* **334**:235-8.

Yung BY, Kornberg A. (1988) . Membrane attachment activates dnaA protein, the initiation protein of chromosome replication in Escherichia coli. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **85**:7202-5.

Yuzhakov A, Kelman Z, O'Donnell M. (1999). Trading places on DNA--a three-point switch underlies primer handoff from primase to the replicative DNA polymerase. *Cell.* **96**:153-63.

Z

Zechiedrich EL, Cozzarelli NR. (1995). Roles of topoisomerase IV and DNA gyrase in DNA unlinking during replication in Escherichiacoli. *Genes Dev.* **9**:2859-69.

Zhao X, Muller EG, Rothstein R. (1998). A suppressor of two essential checkpoint genes identifies a novel protein that negatively affects dNTP pools. *Mol Cell.* **2**:329-40.

Zheng L, Zhou M, Chai Q, Parrish J, Xue D, Patrick SM, Turchi JJ, Yannone SM, Chen D, Shen B. (2005). Novel function of the flap endonuclease 1 complex in processing stalled DNA replication forks. *EMBO Rep.* **6**:83-9.

ZweigerG, MarczynskiG, ShapiroL.(1994).A Caulobacter DNA methyltransferase that functions only in the predivisinal cell. *J Mol Biol.* **235**:472-85.

Résumé :

Dans *Escherichia coli* la Dam Methyl Transferase (DamMT) est responsable du transfert d'un groupement méthyle sur les adénosines situés au cœur du tétranucléotide GATC; il s'agit donc d'une activité post répllicative. Ainsi, après le passage de la fourche de répllication, le brin d'ADN nouvellement synthétisé est non méthylé – l'ADN est dit hémiméthylé. L'ADN reste hémiméthylé pendant une brève période - de l'ordre de la minute - avant d'être reméthylé par la DamMT. L'hypothèse de l'implication de la méthylation de l'ADN dans le contrôle général du programme de maintenance de l'ADN repose essentiellement sur cette observation, puisque l'ADN hémiméthyle – exception faite de l'origine de répllication et de la région promotrice du gène *dnaA* – est diagnostique du passage récent de la fourche de répllication. Cette hypothèse, et le criblage phylogénomique qui en a découlé a conduit à l'identification de plusieurs gènes dont les produits sont supposés être impliqués dans la maintenance de l'ADN.

yjaG est l'un de ces gènes. Il a été renommé *cycC* en raison des dérèglements de la progression du cycle cellulaire associés à un mutant nul de ce gène. L'étude effectuée au cours de ma thèse s'attachera à expliquer l'état actuel de nos connaissances sur la protéine CycC et de son implication dans le processus de répllication de l'ADN. Nos résultats montrent que la protéine CycC est impliquée dans la processivité de la répllication lorsqu'il y a un dommage au niveau de l'ADN. CycC spécifie une activité qui conduit à freiner les fourches de répllication, afin de prévenir des avortements des réplisomes. La surexpression de CycC bloque l'initiation de la répllication entre l'ouverture de la molécule d'ADN et le chargement de l'hélicase répllicative. Nous proposons que CycC interagisse avec le complexe répllicative et ralentit les fourches de répllication. Ce ralentissement prévient de nouvelles collisions lorsque les cellules sont dans des conditions de stress-qui cause des arrêts de la répllication.

Mots clés: initiation de la répllication, réactivation des fourches, processivité de la répllication

Sammury:

In *Escherichia coli* the Dam Methyl Transferase (DamMT) is responsible for the transfer of a methyl group on the adenosine located in tetranucleotide GATC, so this is a post-replicative activity. Thus, after the passage of the replication fork, the newly synthesized DNA strand is unmethylated - DNA is called hemimethylated. DNA remains hemimethylated in a brief period - about a minute - before being reméthylé by DamMT. The hypothesis of the involvement of DNA methylation in the general control of the maintenance program of the DNA is essentially on this observation, since the hemimethylated DNA - except the origin of replication and the region *dnaA* gene promoter - is diagnostic of the recent passage of the replication fork. This assumption and phylogenomics screening has led to the identification of several genes whose protein are supposed to be involved in the maintenance of DNA.

yjaG is one of these genes. It was renamed *cycC*, the cell cycle progression is deregulated with a null mutant of this gene. The study in my thesis will focus on explaining the current state of our knowledge of the *cycC* protein and its involvement in the process of DNA replication. Our results show that the CycC protein is involved in the processivity of replication when there is damage into the DNA. CycC specifies an activity that leads to slow replication forks to prevent abortions of replisomes. CycC overexpression blocks the initiation of replication between the open complex of the DNA at *oriC* and the loading of the replicative helicase. We propose that CycC interacts with the replicative complex and slows replication forks. This slowdown replication prevents new collisions when cells are under stress, causing replication stops.

keywords: initiation of replication, forks reactivation, processivity of replication.