



HAL
open science

Etude du rôle de la région terminale du chromosome dans le positionnement, la ségrégation du chromosome et le contrôle de la division cellulaire chez *Escherichia coli*

Elise Lebailly

► To cite this version:

Elise Lebailly. Etude du rôle de la région terminale du chromosome dans le positionnement, la ségrégation du chromosome et le contrôle de la division cellulaire chez *Escherichia coli*. Biologie cellulaire. Université Paul Sabatier - Toulouse III, 2016. Français. NNT : 2016TOU30259 . tel-01591559

HAL Id: tel-01591559

<https://theses.hal.science/tel-01591559>

Submitted on 21 Sep 2017

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

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

Université Fédérale



Toulouse Midi-Pyrénées

THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par :

Université Toulouse 3 Paul Sabatier (UT3 Paul Sabatier)

Présentée et soutenue par :

Elise LEBAILLY

le 30 septembre 2016

Titre :

Etude du rôle de la région terminale du chromosome dans le positionnement, la ségrégation du chromosome et le contrôle de la division cellulaire chez *Escherichia coli*

École doctorale et discipline ou spécialité :

ED BSB : Microbiologie

Unité de recherche :

LMGM - UMR5100

Directeur/trice(s) de Thèse :

Dr. François CORNET , Directeur de Recherche, CNRS, LMGM Toulouse

Jury :

Dr Sylvie REVERCHON, Maître de Conférences, UCBL, INSA, Lyon (Rapportrice)
Dr. Frédéric BOCCARD, Directeur de Recherche, CNRS, i2bc, Gif-Sur-Yvette (Rapporteur)
Dr. Marcelo NOLLMANN, Directeur de Recherche, CNRS, CBS, Montpellier (Rapporteur)
Pr. Pascal LE BOURGEOIS, Professeur, UPS, INSA, Toulouse (Président du Jury)

Remerciements

Après dix ans à l'université dont six à l'université Paul Sabatier, presque cinq ans au LMGM, quatre ans de thèse, trois mois et demi à rédiger ce manuscrit, un mois à préparer la soutenance, plus de deux heures à présenter mes travaux devant une salle comble... Je n'imaginai pas que la dernière étape avant l'impression de ma thèse, l'écriture des remerciements, allait me demander autant de temps, et allait être aussi dure émotionnellement parlant (et oui, il est temps de tourner la page !).

Je remercie tout d'abord les membres de mon Jury, Madame Reverchon et Messieurs Boccard, Nollmann et Le Bourgeois, d'avoir accepté de juger mes travaux de thèse.

Je tiens ensuite à remercier François, qui m'a accueilli dans son équipe lorsque je suis arrivée sur Toulouse, avec l'envie d'étudier le cycle cellulaire bactérien. Merci de m'avoir fait confiance, de m'avoir laissé beaucoup de liberté dans le choix et la conduite de mes différents projets, et de m'avoir encadré, avec patience, pendant toutes ces années.

Pendant ces quelques années dans l'équipe Cornet, j'ai eu la chance de travailler aux côtés de personnes extraordinaires que je tiens à remercier : Philou, mon tout premier encadrant de stage, et mon voisin de bureau préféré... ; Mathieu, qui m'a tout appris en microscopie ; Carine, toujours disponible pour un conseil technique, un protocole... ; Luu, ma deuxième maman, toujours souriante, généreuse, disponible, prévenante... je ne peux pas me passer de toi ; Estelle, ma coéquipière de randonnées, qui a préféré le climat anglais à la douceur du sud-ouest ; Maya, avec tes « mayades », tes références cinématographiques et musicales, tes expériences culinaires... tu as toujours su mettre une bonne ambiance dans le labo ; Caro, nos discussions sur tout et n'importe quoi (la météo, les bijoux, le shopping, les vacances, les people...) vont me manquer ; Florian, maintenant tu vas pouvoir mettre tout le bazar que tu veux sur ton bureau et ta paillasse, je ne serai plus là pour râler ; Jérôme (qui n'est pas membre de l'équipe Cornet, mais qui m'a tellement aidé pour la microscopie), merci pour ta transversalité, tes conseils, tes discussions footballistiques...

Ces cinq dernières années, je les ai passés au sein de l'équipe Cornet, mais aussi, et surtout, à l'IBCG, qui est un peu ma seconde maison. Ainsi je tiens aussi à remercier tous les membres du LMGM, ainsi que les membres du LBME. Et en particulier les copains de l'UPSIDUM et de la machine à café : Natacha, Alix, Clément, Duy Khanh, Ramtin, Stéph et Yves.

Certains vont même avoir le droit à un double remerciement, puisqu'ils peuvent entrer dans plusieurs catégories : camarade de promo, collègue de labo, copain de l'UPSIDUM, ami... Alix, tu entres dans toutes les catégories, sauf une, malgré les rumeurs qui ont pu circuler sur nous pendant des années ; Stevie, tu n'étais pas physiquement à l'IBCG, mais c'est tout comme, puisque tu étais de toutes les sorties, les soirées... ; Pierre, malgré ton exil dans le nord, puis dans le grand nord, tu restes le plus fervent supporteur du TFC que je connaisse; Natacha, toujours disponible pour aller se promener, faire les magasins, boire une bière, aller voir un match... j'espère qu'un jour on aura l'occasion de vivre de nouveau dans la même ville ; Clément, le meilleur skieur de la bande, mais le plus piètre cycliste... heureusement maintenant tu as des stabilisateurs ; Christophe, nos emplois du temps respectifs ne nous permettent pas de nous voir régulièrement, mais c'est toujours agréable de partager un moment avec toi.

Et parce qu'il n'y a pas que le travail dans la vie, je tiens aussi à remercier tous mes amis d'Angers (Avec une spéciale dédicace pour mon A.P. préférée ^^), de Toulouse, et d'ailleurs... Ainsi que tous mes copains et copines de course à pied, avec qui je passe la plupart de mes soirées, et aussi une partie de mes week-end (Avec un remerciement spécial à ma championne Audrey !).

Evidemment, je remercie aussi Florent, qui me comble de bonheur, me supporte tous les jours (et ce n'est pas une mince affaire, surtout pendant les derniers mois de thèse), me soutient, m'encourage et respecte mes choix, quels qu'ils soient.

Et parce qu'il n'y a pas que le travail et les amis dans la vie, je tiens aussi à remercier mes frères et sœurs : Sarah (Avec un remerciement spécial pour la relecture du manuscrit et la correction des fautes d'orthographe !), Félix, Adèle et Josef (Je vous aime mes loulous, c'est tellement génial d'avoir des frères et sœurs comme vous !) ; mes oncles et tantes (Liliane, Arlette, Annie...), ma cousine Clémentine, mon parrain Patrick (et aussi Sophie), et ma marraine Annick (et Jean-Claude bien sûr).

Enfin, pour finir, je me dois de remercier ceux sans qui je ne serais pas ce que je suis actuellement : Papa et Maman, merci pour tout, et merci de tout mon cœur !

Sommaire

SOMMAIRE	- 5 -
ABREVIATIONS	- 7 -
TABLE DES FIGURES	- 9 -
INTRODUCTION	- 11 -
1. Organisation du génome d'<i>Escherichia coli</i>	- 13 -
1.1. Généralités	- 13 -
1.2. Le chromosome d' <i>E. coli</i>	- 15 -
1.3. Structuration du chromosome d' <i>Escherichia coli</i> à l'échelle du Kb	- 33 -
1.4. Structuration du chromosome d' <i>E. coli</i> en MacroDomaines	- 69 -
2. Le cycle cellulaire d'<i>E. coli</i>	- 73 -
2.1. Généralités sur le cycle cellulaire	- 73 -
2.2. Les paramètres du cycle cellulaire bactérien	- 75 -
2.3. L'élongation cellulaire	- 77 -
2.4. La réplication du chromosome.....	- 78 -
2.5. Ségrégation des chromosomes	- 91 -
2.6. La division cellulaire	- 105 -
3. Zoom sur la région terminale du chromosome	- 125 -
3.1. MatP : La Protéine centrale du MacroDomaine Ter	- 125 -
3.2. FtsK : La protéine de couplage de la ségrégation et de la division.....	- 143 -
3.3. Le « <i>Ter Linkage</i> » et le positionnement de l'anneau Z.....	- 157 -
I. RESULTATS	- 159 -
1. <u>Partie 1</u> : Rôle de MatP dans le positionnement du chromosome et le contrôle de la division cellulaire	- 161 -
1.1. Méthodes d'analyse du positionnement du chromosome	- 161 -
1.2. « The MatP protein controls chromosome orientation and cell division in <i>E. coli</i> ».....	- 171 -
1.3. Résultats complémentaires sur le rôle de MatP dans l'organisation du chromosome et le contrôle de la division cellulaire	- 205 -
1.4. Résultats préliminaires sur les conséquences du déplacement d'un site <i>matsS</i> en dehors de <i>ter</i> ..	- 215 -

2. Partie 2 : Rôle de la TopoIV dans les étapes tardives du cycle cellulaire	- 229 -
2.1. Résultats préliminaires.....	- 229 -
2.2. Mise au point d'un outil permettant de moduler l'expression de la TopoIV	- 231 -
2.3. Effets synergiques de la TopoIV, de XerCD/ <i>dif</i> /FtsK et de MatP.....	- 233 -
2.4. Intégration des résultats dans l'article « Mapping Topoisomerase IV Binding and Activity Sites on the E. coli Genome »	- 243 -
CONCLUSION, DISCUSSION ET PERSPECTIVES	- 245 -
1. Conclusion générale	- 246 -
1.1. Rôle de MatP dans l'organisation globale du chromosome.....	- 246 -
1.2. MatP contrôle la division cellulaire via la localisation de SlmA.....	- 246 -
1.3. MatP crée un substrat préférentiel pour FtsK.....	- 247 -
1.4. Contrôle de l'activité de la TopoIV à la fin du cycle cellulaire	- 247 -
2. Modèle	- 249 -
2.1. En présence de MatP	- 249 -
2.2. En absence de MatP	- 253 -
3. Discussion et perspectives	- 255 -
3.1. MatP, l'orientation du chromosome et le contrôle de la division cellulaire	- 255 -
3.2. La TopoIV, la résolution des liens d'intercaténation et la recombinaison XerCD/ <i>dif</i>	- 262 -
REFERENCES	- 265 -
ANNEXE 1.....	- 285 -
ANNEXE 2.....	- 287 -

Abréviations

aa	Acide Aminé
ADN	Acide Désoxyribonucléique
ADP	Adénosine Monophosphate
ara	Arabinose
ARN	Acide Ribonucléique
ATP	Adénosine Triphosphate
BIME	Bacterial Intersperde Mosaic Element
Chi	Crossover Hotspot Instigator
dif	Deletion-Induced Filamentation
DO	Densité Optique
EPOD	Extensive Protein Occupancy Domain
FHAR	FtsK High Activity Region
FROS	Fluorescent Repressor-Operator System
GFP	Green Fluorescent Protein
H-NS	Histone-like Structuring Protein
IHF	Integration Host Factor
IPTG	Isopropyl β -D_1-thiogalactopyranoside
IRU	Intragenic Repeat Unit
IS	Insertion Sequence
Kb	Kilobases
kDa	Kilo Dalton
KOPS	FtsK Orienting Polarized Sequence
<i>matS</i>	Macrodomain Ter Sequence
Mb	Mégabases
NAPs	Nucleoid-Associated Proteins
nM	nano molaire
NS	Non Structuré
nt	nucléotide(s)
pb	Paire de bases
PBP	Penicillin Binding Protein
pol	Polymérase
REP	Repetitive Extragenic Palindromes

RFT	Replication Fork Trap
RIDA	Regulatory Inactivation of DnaA
RSA	Repetitive Sequence Element A
SBS	SlmA Binding Site
SMC	Structural Maintenance of Chromosome
SSB	Single Strand Binding
<i>ter</i>	région terminale du chromosome
Topo	Topoisomérase
<i>wt</i>	wild type

Table des figures

Figure 1 : Echelle de l'organisation des génomes	- 14 -
Figure 2 : Localisation d' <i>oriC</i> , de <i>dif</i> et des sites <i>Ter</i> sur le chromosome d' <i>E. coli</i>	- 16 -
Figure 3 : Localisation des séquences palindromiques répétées sur le chromosome d' <i>E. coli</i>	- 18 -
Figure 4 : Distribution des sites <i>Chi</i> sur le chromosome d' <i>E. coli</i>	- 22 -
Figure 5 : Distribution des sites KOPS sur le chromosome d' <i>E. coli</i>	- 22 -
Figure 6 : Les sites <i>matS</i>	- 24 -
Figure 7 : Les sites SBS	- 24 -
Figure 8 : Organisation du génome en réplichores	- 28 -
Figure 9 : Représentation du GC skew le long du chromosome d' <i>E. coli</i>	- 30 -
Figure 10 : Effets de la fixation de HU sur la molécule d'ADN	- 34 -
Figure 11 : Effets de la fixation d'IHF sur la molécule d'ADN	- 36 -
Figure 12 : Effets de la fixation de FIS sur la molécule d'ADN	- 36 -
Figure 13 : Effets de la fixation de H-NS sur la molécule d'ADN	- 38 -
Figure 14 : Effets de la fixation de Dps sur la molécule d'ADN	- 40 -
Figure 15 : Répartition des NAPs en fonction des phases de croissance	- 42 -
Figure 16 : Fixation de MukB sur l'ADN	- 46 -
Figure 17 : Observation du nucléoïde d' <i>E. coli</i> en microscopie électronique	- 50 -
Figure 18 : Altération de la topologie de l'ADN lors de la transcription et de la réplication	- 54 -
Figure 19 : Activités des différentes topoisomérases	- 56 -
Figure 20 : Mécanisme d'action des topoisomérases de type II	- 60 -
Figure 21 : Régulation du niveau de superhélicité positive par Fis, la Gyrase et la TopoI	- 64 -
Figure 22 : Résolution des contraintes topologiques induites par la réplication	- 66 -
Figure 23 : Organisation du chromosome en MacroDomaines	- 70 -
Figure 24 : Les paramètres du cycle cellulaire	- 76 -
Figure 25 : Rôle de Fis et IHF dans l'initiation de la réplication par DnaA	- 80 -
Figure 26 : Séquestration des origines par SeqA	- 82 -
Figure 27 : Système RIDA (Regulatory Inactivation of DnaA)	- 86 -
Figure 28 : Différence entre la cohésion des loci et le colocalisation des foci	- 90 -
Figure 29 : Régulation de l'activité de la TopoIV à l'arrière des fourches de réplication	- 94 -
Figure 30 : Orientation <i>Left-Ori-Right</i> du chromosome d' <i>E. coli</i>	- 96 -
Figure 31 : Chorégraphie du chromosome au cours du cycle cellulaire	- 98 -

Figure 32 : Recrutement séquentielle des différentes protéines du divisome	- 104 -
Figure 33 : Modèles de constriction du septum	- 106 -
Figure 34 : Le système MinCDE	- 110 -
Figure 35 : Le système d'occlusion par le nucléoïde SlmA	- 114 -
Figure 36 : Le gène <i>matP</i>	- 126 -
Figure 37 : Structure de MatP	- 128 -
Figure 38 : Profil de ségrégation du locus <i>ter-6</i>	- 134 -
Figure 39 : Le « <i>Ter Linkage</i> »	- 136 -
Figure 40 : Régulation de l'activité de la TopoIV par MatP et MukB	- 140 -
Figure 41 : Structure de FtsK	- 142 -
Figure 42 : Modèle de translocation de l'ADN par les sous-domaines α et β de FtsK	- 144 -
Figure 43 : Modèle de ségrégation de la région <i>ter</i> par FtsK	- 150 -
Figure 44 : Formation des dimères de chromosomes	- 152 -
Figure 45 : Mécanisme de recombinaison spécifique de site XerCD à dif	- 154 -
Figure 46 : Système de double localisation utilisé pour analyser le positionnement des loci	- 160 -
Figure 47 : Utilisation de MicrobeTracker et SpotFinderM	- 164 -
Figure 48 : Illustration des analyses possibles avec les scripts développés sous Matlab	- 168 -
Figure 49 : Position relative des foci dans la longueur de la cellule, dans les cellules à 1 focus	- 204 -
Figure 50 : Position relative des foci dans la longueur de la cellule, dans les cellules à 2 foci	- 206 -
Figure 51 : Comparaison des distances interfocales entre foci frères	- 210 -
Figure 52 : Comparaison des distances interfocales entre foci non frères	- 212 -
Figure 53 : Phénotype des souches avec 1 site <i>matS</i> déplacé en condition de croissance lente	- 216 -
Figure 54 : Pattern de ségrégation du chromosome dans une souche avec 1 site <i>matS</i> déplacé	- 218 -
Figure 55 : Positionnement des foci dans la longueur de la cellule dans les cellules à 2 foci	- 222 -
Figure 56 : Orientation du chromosome dans une souche avec 1 site <i>matS</i> déplacé	- 224 -
Figure 57 : L'inactivation partielle de la TopoIV est moins bien tolérée dans un contexte <i>matP</i> -	- 228 -
Figure 58 : Constructions pour moduler l'expression de la TopoIV	- 230 -
Figure 59 : Effets de la modulation de l'expression de la TopoIV sur la viabilité cellulaire	- 232 -
Figure 60 : Effets synergiques de la TopoIV, de la recombinaison XerCD/dif et de MatP	- 234 -
Figure 61 : L'apparition de révertants indique une synergie entre la TopoIV et XerCD/dif/FtsK	- 236 -
Figure 62 : Evaluation de la synergie entre la TopoIV et XerCD/ <i>dif</i> par détermination de la CMI	- 240 -
Figure 63 : Evaluation de la synergie entre la TopoIV et MatP par détermination de la CMI	- 242 -
Figure 64 : La région <i>ter</i> : un acteur central dans le positionnement du chromosome...	- 248 -
Figure 65 : Effets de l'absence de MatP sur le positionnement, la ségrégation...	- 252 -

Introduction

1. Organisation du génome d'*Escherichia coli*

1.1. Généralités

Le génome est l'ensemble du matériel génétique d'un organisme. Quel que soit le type cellulaire, il est composé d'un enchaînement de nucléotides, variable d'une espèce à une autre. La localisation et la configuration du génome est dépendante du type cellulaire. Chez les eucaryotes, le génome est segmenté sur plusieurs chromosomes linéaires et est contenu dans le noyau. Chez les procaryotes, le génome est principalement porté par un unique chromosome circulaire, et n'est pas séparé du cytoplasme par une membrane.

D'une espèce bactérienne à une autre, les génomes sont très variables, que ce soit par la taille, la configuration linéaire ou circulaire, le nombre de chromosomes... Le plus petit génome bactérien connu, celui de *Candidatus Nasuia deltocephalinicola*, ne fait que 112 Kb alors que celui de *Sorangium cellulosum* fait 13 Mb. La densité de gènes, quant à elle, varie très peu d'un génome à un autre, avec une moyenne d'un gène par Kb (139 gènes pour *C. Nasuia deltocephalinicola* et 9524 pour *S. cellulosum*) (Bennett:2016jh ; Schneiker et al., 2007). La forme chromosomique prédominante chez les bactéries est la forme circulaire. Il existe néanmoins quelques espèces bactériennes avec un chromosome linéaire, comme par exemple *Streptomyces lividans* (Lin et al., 1993) ou *Borrelia burgdoferi* (Ferdows and Barbour, 1989). Enfin, selon les espèces, le génome peut être constitué d'un ou plusieurs chromosomes. Majoritairement, les espèces bactériennes possèdent un unique chromosome, mais certaines espèces en possèdent plusieurs comme par exemple *Vibrio cholerae* qui en possède deux ou *Burkholderia cenocepacia* qui en possède trois (Holden et al., 2009).

La bactérie *Escherichia coli*, organisme modèle en microbiologie et objet de ce manuscrit, possède un génome très « classique ». En effet, *E. coli* possède, comme la grande majorité des bactéries, un unique chromosome circulaire avec une taille moyenne de 4,6 Mb. Il est à noter qu'au sein même de l'espèce, il existe des variations de taille du génome ; par exemple les souches CFT073 et EPL933 ont un chromosome de 5,2 Mb alors que le chromosome de la souche MG1655 K12 fait 4,6 Mb, soit une différence de 600 Kb (Welch et al., 2002).

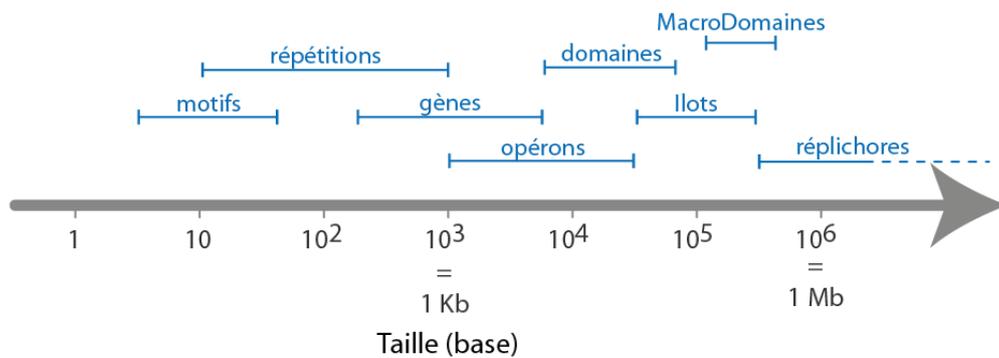


Figure 1 : Echelle de l'organisation des génomes

Le génome d'*Escherichia coli*, comme tous les génomes bactériens, est hautement organisé. On retrouve sur le génome des motifs, répétés ou non, biaisés ou non, des gènes, organisés ou non en opérons/en îlots, des MacroDomaines et des réplichores, dont la taille varie de quelques bases à quelques mégabases. (D'après Rocha *et al.*, 2008)

1.2. Le chromosome d'*E. coli*

Dans cette partie les différents niveaux d'organisation du génome d'*E. coli* seront présentés, du motif de quelques paires de bases, jusqu'aux réplichores de plusieurs Mb, en passant par les gènes d'environ 1 Kb (Figure 1).

1.2.1. Les motifs particuliers

Chez *Escherichia coli*, la réplication est initiée au niveau d'un site unique, *oriC*, et se termine dans la région diamétralement opposée, appelée RFT (pour Replication Fork Trap) et bornée par les sites *Ter*. Dans cette région, on retrouve le site *dif*, impliqué dans la ségrégation des chromosomes nouvellement répliqués.

- *oriC*

E. coli réplique son chromosome à partir d'une unique origine de réplication *oriC* et l'initiation de cette réplication est médiée par une protéine initiatrice DnaA, qui interagit de façon spécifique avec les boîtes DnaA, des séquences répétées non palindromiques de neuf nucléotides (9-mer). *oriC* contient cinq boîtes DnaA. L'extrémité gauche d'*oriC*, appelée cluster AT du fait de sa richesse en AT, est constituée de trois 13-mer répétés (Figure 2). Cette région riche en AT est appelée DUE (pour DNA Unwinding Elements). En plus de ces séquences, il y a aussi dans la région *oriC* des sites de fixations pour des protéines accessoires comme IHF ou FIS (voir partie 1.3.1) (Messer, 2002).

- *Ter*

La réplication se propage de manière bi-directionnelle d'*oriC* vers la région diamétralement opposée, où la propagation des fourches de réplication est stoppée par les complexes nucléoprotéiques *Ter/Tus*. Les complexes *Ter/Tus* sont asymétriques, et en fonction de leur orientation, permettent ou arrêtent, la progression des fourches.

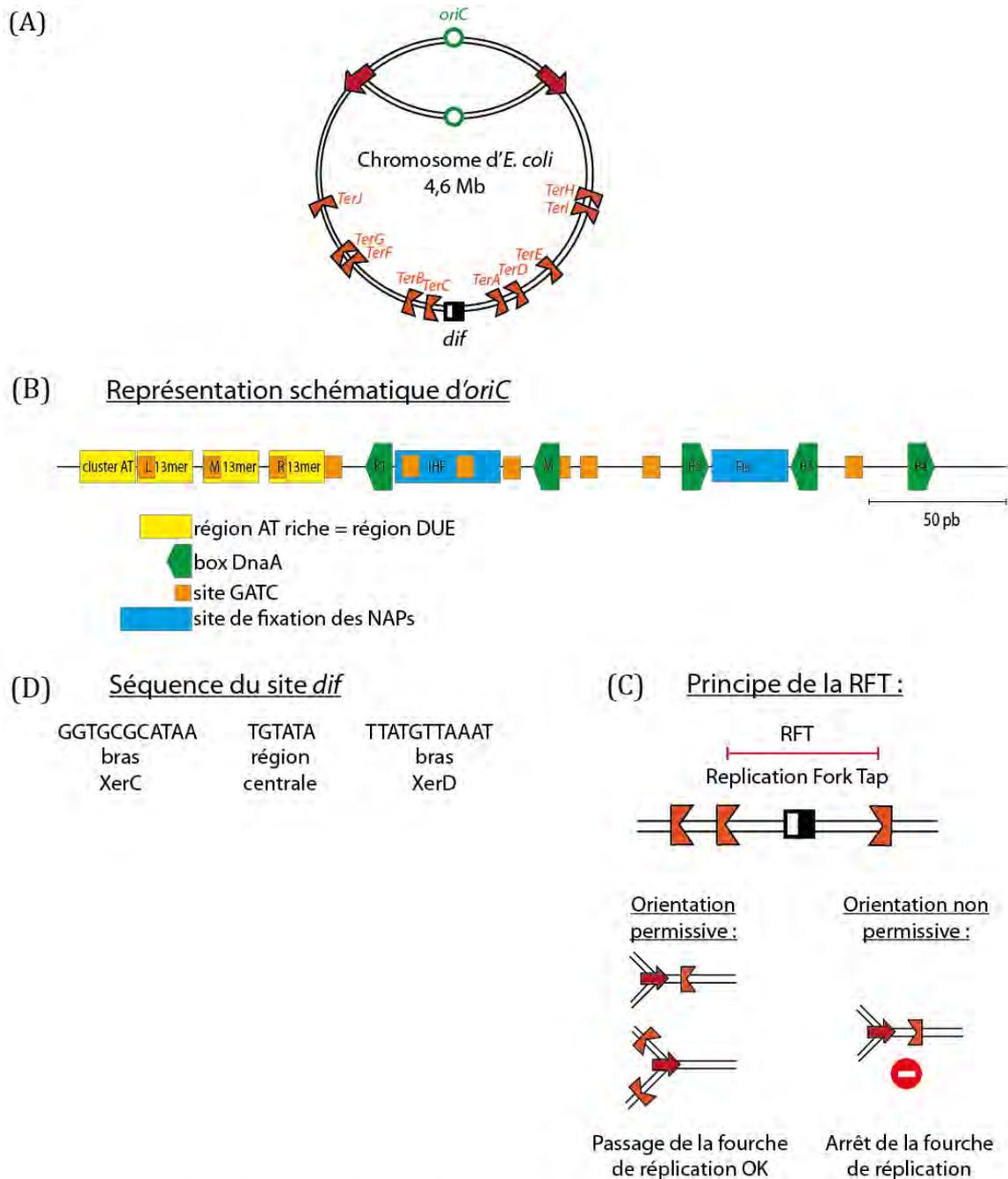


Figure 2 : Localisation d'oriC, de dif et des sites Ter sur le chromosome d'E. coli

(A) La réplication du chromosome d'*E. coli* est initié au niveau d'*oriC*. Les fourches de réplication (flèches rouges) progressent de manière bidirectionnelle d'*oriC* vers la région diamétralement opposée, la région de terminaison de la réplication. *dif*, nécessaire à la résolution des dimères de chromosomes, est situé dans cette région. (B) *oriC* est composée de box DnaA, de sites GATC et d'un cluster AT-riche (D'après Messer et al., 2002). (C) L'orientation des dix sites *Ter* délimite un piège appelé RFT ou «Replication Fork Trap», où s'arrête la réplication. La fourche de réplication n'est pas arrêtée par les complexes *Ter/Tus* en orientation permissive. En revanche, en orientation non permissive, le complexe *Ter/Tus* stoppe la fourche de réplication. Suivant la durée de réplication de chacune des fourches, la réplication s'achève au niveau du site *TerA* ou du site *TerC*. (D) La recombinaison spécifique de site XerCD permettant la résolution des dimères à lieu à *dif*. *dif* est composé d'un bras de fixation pour XerC, d'une région centrale où à lieu l'échange de brin, et d'un bras de fixation de XerD.

La disposition des dix sites *Ter* est telle que les fourches peuvent entrer dans cette zone mais ne peuvent en sortir (Figure 2). Les sites *TerA* et *TerC* définissent la « Replication Forks Trap » (RFT) ou zone d'arrêt des fourches de réplication.

Les sites *Ter* font entre 22 et 23 pb, mais seule la séquence coeur de 11 pb, entre la position 9 et la position 19, et une paire GC à la position 6 sont strictement conservées. Les sites *Ter* n'ont pas tous la même capacité à bloquer les fourches de réplication : les sites *TerA* et *TerC*, qui encadrent la RFT ont une capacité à bloquer les fourches de réplication plus forte que les sites *TerH* et *TerJ*, les plus éloignés de la RFT (Coskun-Ari and Hill, 1997).

- *dif*

Dans la zone RFT, on note la présence du site *dif* (pour Deletion-Induced Filamentation). Il est constitué d'une région centrale de 6 pb, et de deux bras de fixation avec des séquences partiellement inversées répétées de 11 pb (Figure 2). Le site *dif* est reconnu par les recombinases à tyrosine XerC et XerD, qui se fixent sur leur bras de fixation respectif. La région centrale est le siège des réactions de coupure et d'échange de brins catalysées par XerC et XerD (Blakely et al., 1993). La recombinaison XerCD au site *dif* est nécessaire à la résolution des dimères de chromosomes, et donc à la ségrégation des chromosomes frères, dans 15% des cellules (voir partie 3.2.3) (Blakely et al., 1991).

1.2.2. Les séquences répétées

Le génome d'*E. coli* possède, en plus des séquences particulières énoncées précédemment, un grand nombre de séquences répétées. Certaines de ces séquences répétées sont présentes partout sur le chromosome, sans biais d'orientation ou de positionnement, alors que d'autres présentent un biais dans leur orientation ou leur répartition sur le chromosome.

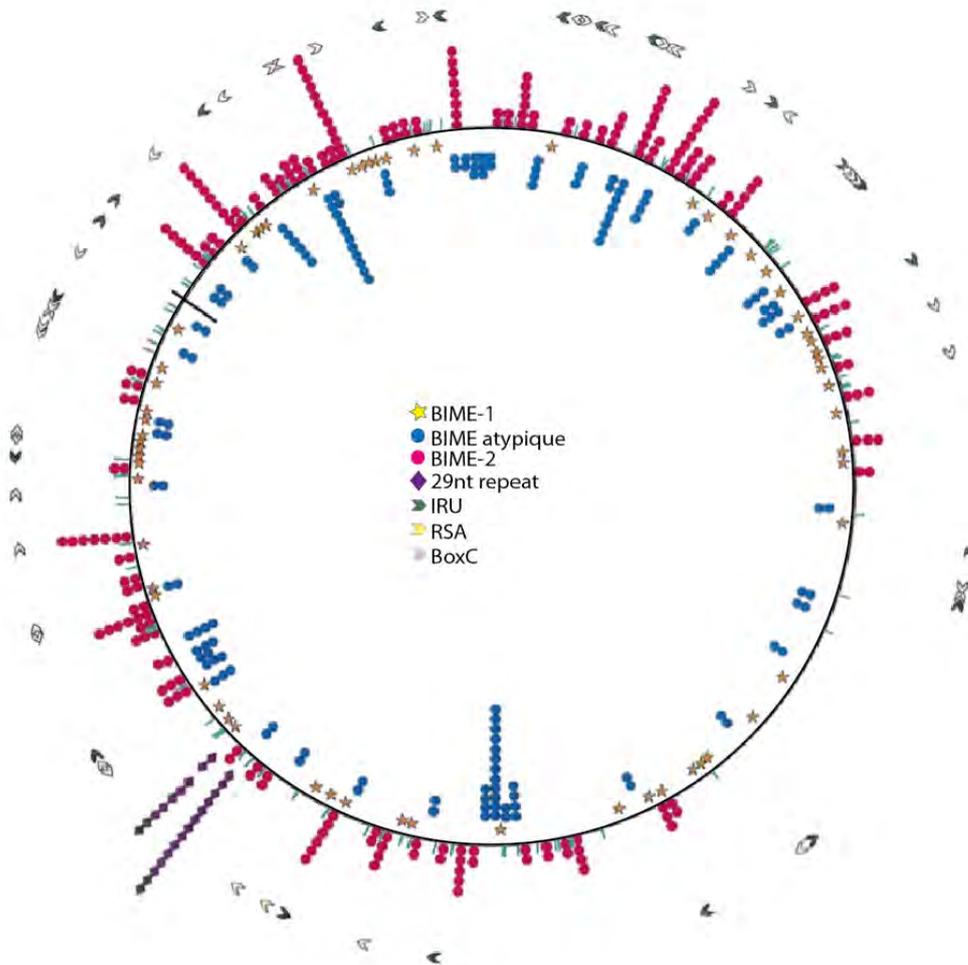


Figure 3 : Localisation des séquences palindromiques répétées sur le chromosome d'*E. coli*

Le chromosome d'*E. coli* comporte un grand nombre de séquences palindromiques répétées notamment les BIMEs, les IRU, les RSA et les BoxC et les 29nt repeats, présents partout sur le chromosome (D'après Bachellier *et al.*, 1999).

1.2.2.1. Les séquences répétées non biaisées

Parmi les séquences répétées non biaisées, on trouve principalement les séquences palindromiques répétées. Ces séquences palindromiques répétées sont regroupées en sept familles différentes, mais seulement cinq de ces familles sont bien documentées (les RSA, les IRU, les répétitions de 29 pb, les BIMEs et les boxC). Ces séquences sont extragéniques et non-codantes (Bachellier et al., 1999).

- IRU et RSA

Les séquences répétées les plus simples sont les IRU (pour Intragenic Repeat Unit) et les RSA (pour Repetitive Sequence Element A). Les IRU sont des séquences de 127 pb répétées 21 fois sur le chromosome, alors que les RSA sont des séquences de 151 pb répétées six fois sur le chromosome (Figure 3) (Bachellier et al., 1999).

- 29nt repeat

Il existe aussi des séquences répétées composites modulaires : les 29nt repeat ou répétitions de 29nt. Il y a en tout vingt-trois répétitions de 29nt sur le génome de *E. coli*. La première région de répétitions, composée de quatorze répétitions séparées par un « spacer » (32 ou 33 pb, sans aucune conservation de séquences), est située à proximité du gène *iap*. Une deuxième région de répétitions de 29nt, située à 24 kb de cette région, est composée de deux groupes de répétitions séparés par une séquence de 500 pb. Le premier groupe est composé de deux répétitions séparées par un « spacer » de 32 pb et le second groupe est composé de sept répétitions, séparées par un des « spacer » de 32 pb (Figure 2) (Nakata et al., 1989).

- BoxC

Les séquences BoxC sont des palindromes imparfaits de 56 pb, avec une extrémité 5' riche en pyrimidine (queue) et une extrémité 3' riche en purine (tête).

Sur le chromosome d'*E. coli* K12, on trouve vingt-deux régions contenant une ou deux BoxC, soit un total de 32 BoxC (Figure 3) (Bergler et al., 1992).

- BIMEs

Enfin les BIMEs (pour Bacterial Intersperse Mosaic Element) sont la principale famille d'éléments répétés, avec près de 600 copies, soit environ 1% du génome (Figure 3). Les BIMEs sont généralement constitués de deux REP (Repetitive Extragenic Palindromes) en orientation inverse, séparés par un « linker » de taille variable. Les REP sont des palindromes imparfaits de taille variable (entre 30 et 40 nt de long) avec un tétranucléotide hautement conservé, GTAC, localisé au pied du palindrome. Il existe trois principaux types de REP (y, z1 et z2), et deux familles de BIMEs, en fonction de la paire de REP présente et de la taille du linker (z1 et y séparés par un long linker pour la famille BIME-1, z2 et y séparés par un court linker pour la famille BIME-2). Il existe aussi des BIMEs atypiques, portant différentes combinaisons de REP, et avec différentes tailles de linker (Bachelier et al., 1994).

Les BIMEs ont de nombreuses fonctions dans la cellule. Ils sont impliqués dans la régulation de l'expression des gènes, en fonctionnant comme un terminateur de transcription ou en stabilisation des ARNm (Espéli et al., 2001), ainsi que dans la structuration de l'ADN, en étant des sites de fixations ou d'activité pour IHF (voir partie 1.3.1), l'ADN Polymérase I et l'ADN Gyrase (voir partie 1.3.3.3) (Boccard and Prentki, 1993; Espéli and Boccard, 1997). De plus, les BIMEs sont aussi des cibles spécifiques pour de nombreux événements de transpositions et de recombinaison, notamment l'insertion de certains IS (pour Insertion Element) comme *IS1397* (Clément et al., 1999) ou *IS621* (Choi et al., 2003).

1.2.2.2. Les séquences répétées avec biais d'orientation

Du fait du biais de composition en base GC entre le brin avancé et le brin retardé (voir partie 1.2.4), la localisation des motifs, en particulier les motifs riches en G tels les KOPS et les sites Chi, se fait préférentiellement sur le brin avancé, créant un changement d'orientation de ces sites à *oriC* et au niveau de la RFT (voir partie 1.2.1).

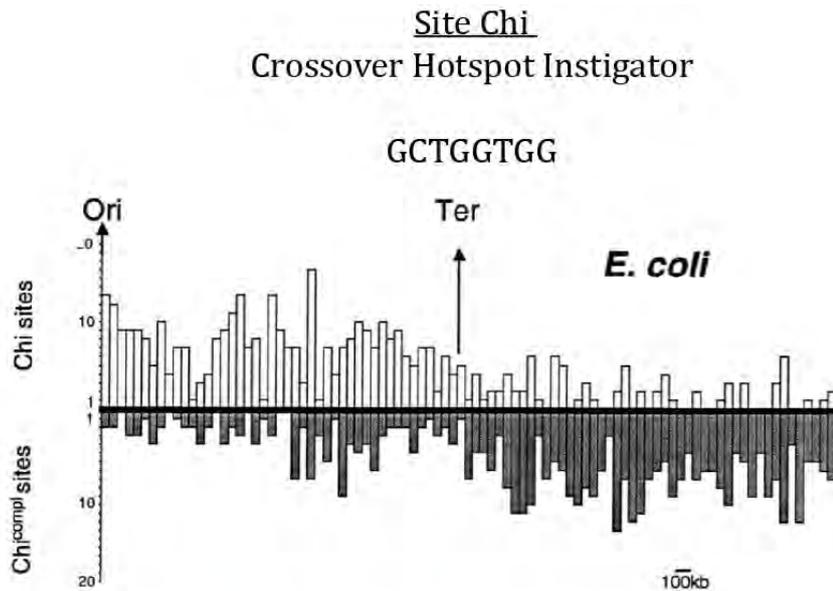


Figure 4 : Distribution des sites *Chi* sur le chromosome d'*E. coli*

Les sites Chi sont des motifs de 8 pb riche en G, que l'on retrouve préférentiellement sur le brin avancé de réplication. Ce biais de positionnement sur le brin avancé entraîne un biais d'orientation des sites. Les barres vides représentent le nombre de site *Chi* en fonction de la position sur le chromosome, en partant d'*oriC*. Les barres grisées représentent le nombre de sites *Chi* complémentaires. L'orientation de ces sites change au niveau de l'origine de réplication (*Ori* sur le graphique) et de la région de terminaison de la réplication (*Ter* sur le graphique) (D'après El Karoui *et al.*, 1999)

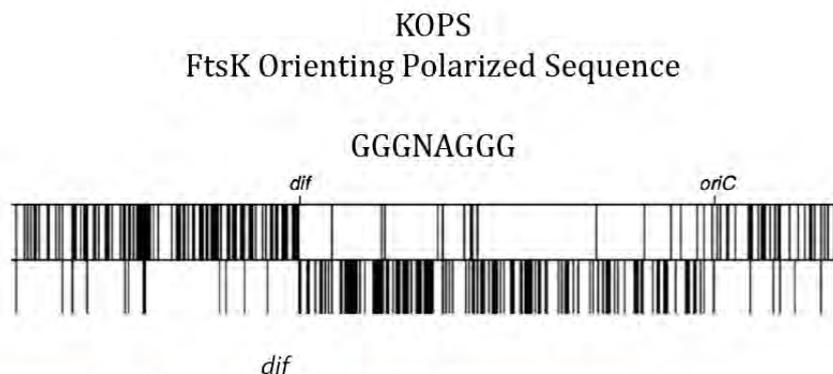


Figure 5 : Distribution des sites KOPS sur le chromosome d'*E. coli*

Chaque barre en noir représente un site KOPS sur le chromosome d'*E. coli*, localisé soit sur le brin supérieur, soit sur le brin inférieur d'ADN. Les sites KOPS sont préférentiellement localisés sur le brin avancé de réplication, qui correspond sur le graphique au brin supérieur jusqu'au site *dif*, au brin inférieur de *dif* à *oriC*, et de nouveau au brin supérieur après *oriC*. Les sites KOPS sont presque tous orientés en direction du site *dif*, qui marque la région de terminaison de la réplication. (D'après Bigot *et al.*, 2005)

- *Chi*

Les sites *Chi* (pour Crossover Hotspot Instigator) sont des motifs ADN de 8 pb riches en G (GCTGGTGG) répartis sur tout le chromosome d'*E. coli*, préférentiellement sur le brin avancé (75% des motif *Chi*) (Lobry and Louarn, 2003; Smith et al., 1981). Du fait de cette localisation préférentielle sur le brin avancé, les sites *Chi* présentent un biais d'orientation s'inversant au niveau de l'origine de réplication *oriC* et de la zone de terminaison de la réplication (Figure 4). Le motif *Chi* est le 5^{ème} octamère le plus surreprésenté chez *E. coli* (comparé aux 65 536 octamères possibles). Le biais GC et le fait que le motif *Chi* est composé de codons à usage fréquent ne sont pas suffisant pour expliquer la surreprésentation de ce motif. Il a donc dû y avoir une sélection pour sa fonction du motif *Chi*.

Les sites *Chi* sont impliqués dans la régulation de l'activité de RecBCD. RecBCD a une activité hélicase à ADN et nucléase, et intervient dans la principale voie de réparation des cassures double brin d'ADN chez *E. coli* (Smith, 2001).

- KOPS

Les sites KOPS (FtsK Orienting Polarized Sequence) sont eux aussi des motifs ADN de 8 pb riches en G (GGGNAGGG) présents avec la même densité sur tout le chromosome, et dont l'orientation s'inverse à *oriC* et à *dif* (Figure 5). Les sites KOPS jouent un rôle essentiel dans la résolution des dimères de chromosomes. En effet, la recombinaison spécifique de site XerCD à *dif* nécessite l'activation de XerD par FtsK (voir partie 3.2.1.1), et les sites KOPS, étant préférentiellement localisés sur le brin avancé, permettent d'orienter la translocation de FtsK en direction du site *dif* (Bigot et al., 2005; Levy et al., 2005).

1.2.2.3. Les séquences répétées avec biais de positionnement

Certaines séquences présentent, quant à elles, des biais de positionnement, c'est-à-dire qu'elles sont surreprésentées dans une région spécifique du chromosome. C'est le cas des sites *matS* et des sites SBS.

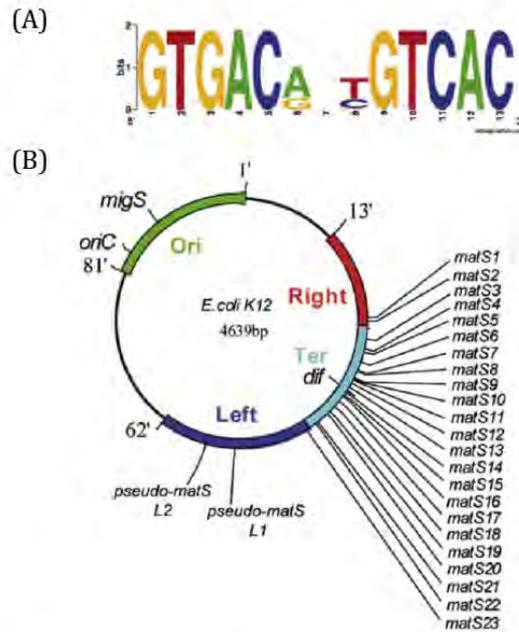


Figure 6 : Les sites *matS*

(A) Logo de 13 pb de la séquence palindromique consensus déduit de la séquence de 21 sites *matS* (sur 23, les sites *matS5* et *matS17* ne sont pas inclus dans cette analyse). La taille des lettres est proportionnelle à la fréquence du nucléotide dans les différentes séquences (matrice poids/position). (B) Les sites *matS* présentent un biais de positionnement sur le chromosome d'*E. coli*. Ils sont tous localisés dans la région terminale du chromosome, sauf les sites *pseudo-matS L1* et *L2*, qui sont localisés dans la région Left (D'après Mercier *et al.*, 2008)

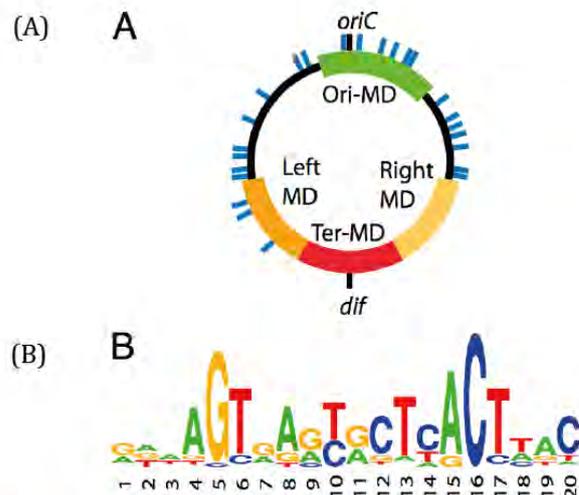


Figure 7 : Les sites SBS

(A) Localisation des sites SBS sur le chromosome d'*E. coli*. Ces sites présentent un biais de positionnement. En effet, ils sont absents de la région terminale du chromosome, ainsi que de la région Right. (B) Logo de 20 pb de la séquence consensus des sites SBS, qui sont relativement variables en composition, exceptée la position 16 qui est conservée. (D'après Cho *et al.*, 2011)

- *matS*

Les sites *matS* (pour Macrodomain Ter Organisation) ont été mis en évidence, par une approche statistique, du fait de leur présence exceptionnelle dans une région de 800 Kb autour du site *dif* et de leur absence du reste du chromosome (Mercier et al., 2008). Ce sont des palindromes incomplets de 13 pb (Figure 6). Ils sont présents au nombre de vingt-trois dans la région terminale du chromosome d'*E. coli*. Les sites *matS* sont également retrouvés sur les chromosomes des Enterobacteriaceae et des Vibrionaceae, toujours dans la région de diamétralement opposée à l'origine de réplication (Mercier et al., 2008).

Les sites *matS* sont les sites de fixation spécifique de la protéine MatP, qui est une protéine essentielle à l'organisation et la ségrégation de la région terminale du chromosome et que nous présenterons plus en détails dans la partie 3.1 (Dupaigne et al., 2012; Espéli et al., 2012; Mercier et al., 2008).

- SBS

A l'inverse des sites *matS*, les sites SBS (pour SlmA Binding Site) sont totalement absents de la région terminale du chromosome. Les sites SBS sont des motifs de 20 pb de compositions variables, comme on peut le voir sur le logo de la séquence consensus présenté Figure 7. En effet, seule la position 16 est conservée entre les vingt-quatre sites SBS potentiels (Cho et al., 2011).

Les sites SBS sont les sites de fixation spécifiques pour la protéine SlmA, qui est impliquée dans le phénomène d'occlusion par le nucléoïde et sera présentée plus en détails dans la partie 2.6.3 (Bernhardt and de Boer, 2005; Cho et al., 2011; Tonthat et al., 2011).

1.2.3. Les gènes

Le génome d'*E. coli*, comme les génomes bactériens en général, est caractérisé par une forte densité de gènes, et donc une faible proportion de séquences non codantes. En effet, *E. coli* K12 a un génome de 4,6 Mb et 4468 gènes avec une taille moyenne de l'ordre du Kb. Ces gènes ne sont pas organisés de manière aléatoire sur le chromosome.

- Organisation en opérons

Les gènes peuvent être organisés en opéron. Le terme opéron apparaît pour la première fois dans la littérature en 1960 ; et est défini comme un groupe de gènes dont l'expression est sous le contrôle d'un opérateur (Jacob et al., 2005). Les opérons sont constitués de plusieurs gènes orientés dans le même sens et sous la dépendance d'un promoteur unique et d'un même mécanisme de régulation. Généralement, les opérons regroupent un ensemble de gènes impliqués dans une même fonction, un même processus métabolique, et cette organisation en opéron permet donc une régulation coordonnée de ces gènes.

- Organisation le long du chromosome

Il apparaît que l'ordre des gènes, chez *E. coli* comme chez les γ -protéobactéries, que l'ordre des gènes est hautement conservé le long du chromosome, selon l'axe origine/terminus de réplication. De nombreuses études montrent une corrélation entre la position des gènes et leur niveau d'expression. Les études les plus anciennes ne mentionnent que l'effet du « *gene copy number* ». En effet, en condition de croissance rapide, plusieurs cycles de réplication peuvent se chevaucher, conduisant à la présence d'un plus grand nombre de copies de la région proche de l'origine de réplication, par rapport à la région terminale. Dans ces conditions, plus un gène va être proche d'*oriC*, plus il va y avoir de copies de ce gène. Cependant, de nombreuses études récentes ont montré que les effets du positionnement chromosomique sur l'expression des gènes étaient dus à de nombreux autres facteurs, et que le dosage des gènes n'étant pas le seul facteur influençant la conservation de l'ordre des gènes le long de l'axe de réplication.

En effet, il a été mis en évidence la présence de domaines EPODs (pour Extensive Protein Occupancy Domains) qui sont majoritairement localisés dans des régions où la majorité des gènes ne sont pas transcrits (Vora et al., 2009). Ces régions faiblement transcrites sont enrichies en sites de fixation, prédits ou déterminés expérimentalement, pour les NAPs (voir partie 1.3.1) et présentent des caractéristiques biophysiques particulières, comme un haut niveau de courbure intrinsèque. Elles pourraient servir à isoler topologiquement les différents domaines chromosomiques (Vora et al., 2009).

De plus, il a été montré chez *Caulobacter crescentus* et *Escherichia coli* que les ARNm transcrits avaient une faible diffusion pendant leur durée de vie, et donc restaient localisés à proximité immédiate de leur site de transcription, créant une compartimentation subcellulaire des protéines dépendante de la carte génétique (Montero Llopis et al., 2010). Cette compartimentation peut avoir de nombreuses conséquences pour la cellule, notamment en favorisant les interactions entre protéines codées par des gènes situés à proximité sur le chromosome. La faible diffusion des ARNm transcrits et la compartimentation subcellulaire qui en découle entraînerait donc une pression de sélection positive pour que les gènes codant des protéines qui interagissent entre elles restent à proximité sur le chromosome. Cette pression de sélection est d'autant plus importante lorsque les gènes codent des protéines peu stables individuellement et dont la stabilité est augmentée lors de la formation de complexes multiprotéiques.

- [Coordination de la réplication et de la transcription](#)

La réplication et la transcription chez les bactéries ont lieu en même temps et sur la même matrice, mais pas à la même vitesse. En effet, la machinerie de réplication (entre 600 et 1000 nt/s) est entre dix et vingt fois plus rapide que la machinerie de transcription (entre 30 et 80 nt/sec).

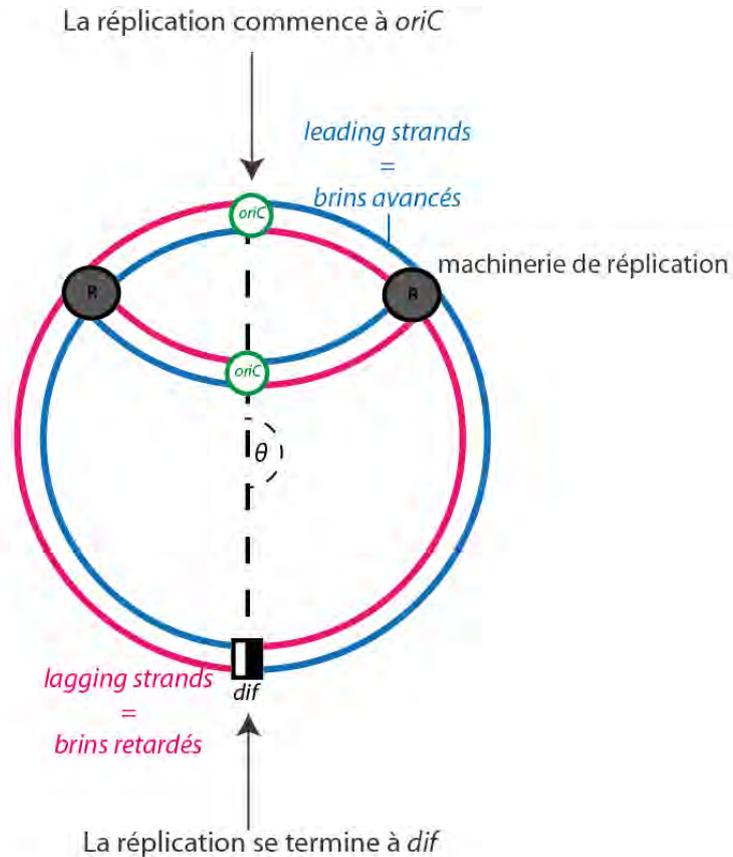


Figure 8 : Organisation du génome en réplichores

La réplication bidirectionnelle, de l'origine de réplication *oriC* à la région terminale de réplication matérialisée par le site *dif*, délimite le chromosome en deux réplichores de taille quasi identique. L'angle entre *oriC* et *dif* fait environ 180°. La réplication ne se fait pas de la même façon pour les deux brins : le brin avancé (en bleu) est répliqué de façon continue, alors que le brin retardé (en rose) est répliqué de manière discontinue. Cette différence de réplication entre les deux brins s'accompagne d'une différence de composition en bases G et C (= GC skew). Le GC skew est plus important sur le brin avancé de la réplication. Les motifs riches en G, tels les sites Chi ou les sites KOPS, sont préférentiellement localisés sur le brin avancé de réplication, et donc sont orientés d'*oriC* vers *dif*. (D'après Rocha *et al.*, 2008)

Les deux processus étant orientés, deux types de collisions sont possibles : (i) la machinerie de réplication est dans la même direction que la machinerie de transcription, il y a un ralentissement du réplisome pour permettre de finir la transcription ou (ii) la machinerie de réplication rencontre la machinerie de transcription de manière frontale, provoquant le décrochage de l'ARN polymérase mais aussi un retard de réplication si la transcription est faible, voire même un arrêt de réplication si la transcription est forte (E. V. Mirkin and S. M. Mirkin, 2007). Cette collision frontale a aussi des conséquences négatives sur le taux de transcription car le décrochage de l'ARN polymérase interrompt la transcription en cours de route. Ce décrochage peut aussi conduire à la formation de transcrits incomplets toxiques pour la cellule (Price et al., 2005).

Pour prévenir les arrêts de réplication, on observe que les gènes les plus fortement exprimés, tels les gènes codants les ARN ribosomiques ou les ARN de transferts, sont principalement orientés de l'origine de réplication vers le terminus de réplication, diminuant le risque de collision frontale et donc le risque d'arrêt de la réplication (Rocha and Danchin, 2003; Srivatsan et al., 2010). De même, la répartition des gènes essentiels est biaisée entre le brin avancé et le brin retardé. En effet, que les gènes essentiels soient faiblement ou fortement exprimés, ils sont plus de 70% à être localisés sur le brin avancé, donc à être orientés dans le même sens que la réplication. Les gènes non essentiels, quant à eux, sont répartis de manière équitable sur les deux brins (Rocha and Danchin, 2003; Srivatsan et al., 2010).

1.2.4. Les réplichores

Nous avons vu précédemment qu'il existait des séquences, ainsi que des gènes, présentant un biais d'orientation selon l'axe origine/terminus de réplication (KOPS, Chi, gènes essentiels et fortement transcrits...). Ces biais d'orientation sont tous influencés par la réplication bidirectionnelle du chromosome d'*E. coli*, qui délimite deux bras de réplication ou réplichores (droit et gauche) allant de l'origine de réplication *oriC* à la zone de terminaison de la réplication (Figure 8). Les deux réplichores sont symétriques, et ont donc une taille très similaire.

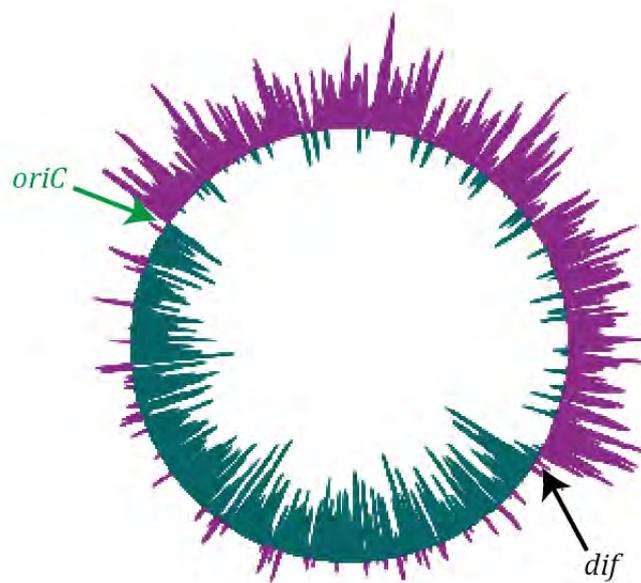


Figure 9 : Représentation du GC skew le long du chromosome d'*E. coli*

Le biais GC est calculé selon le rapport suivant : $(G-C)/(G+C)$. Le calcul est fait grâce au logiciel Artemis (Sanger Institute), sur une fenêtre glissante de 10 Kb. L'extérieur du cercle correspond aux valeurs positives alors que l'intérieur du cercle représente les valeurs négatives du biais GC, calculé uniquement sur le brin supérieur. On voit bien ici le changement du biais à *oriC* et à *dif*.

La réplication se faisant de manière asymétrique, les deux brins de chaque réplichore sont différemment répliqués : l'un des brins, le brin avancé, est répliqué de manière directe de l'origine de réplication vers le terminus alors que l'autre, le brin retardé, est répliqué de manière discontinue et dans le sens inverse (Figure 8).

Le biais de composition en base G et C a été mis en évidence en 1996 en analysant les génomes d'*E. coli*, *B. subtilis* et *H. influenzae* (Lobry, 1996). Les règles de parité de l'ADN supposent qu'il y a autant de A que de T ($n_A=n_T$) et autant de C que de G ($n_G=n_C$) (Chargaff, 1950) au sein d'un brin. On constate que pour ces trois espèces bactériennes, ainsi que pour de nombreuses espèces ayant un brin avancé et un brin retardé, ces règles de parité ne sont pas respectées. En effet, le brin avancé d'*E. coli* est plus riche en G qu'en C (26,22% contre 24,58%) et très légèrement plus riche en T qu'en A (24,69% contre 24,52%). Le biais GC est calculé selon le rapport suivant : $(G-C)/(G+C)$. La représentation du biais GC, calculé sur une fenêtre glissante de 10 Kb, permet de voir très nettement un changement de polarité du rapport au niveau de l'origine ainsi qu'au niveau du site *dif* (Figure 9).

Certains auteurs considèrent qu'une partie du biais de composition en bases G et C est dû au fait que la Cytosine est très instable lorsqu'elle est sur de l'ADN simple brin, et qu'elle peut être transformée en Uracile, si elle est non méthylée, ou directement en Thymine, si elle est méthylée, par déamination (Lutsenko and Bhagwat, 1999). Et comme au cours du cycle cellulaire, le brin avancé reste plus longtemps à l'état monocaténaire, que ce soit pendant la réplication ou la transcription, il pourrait y avoir appauvrissement en Cytosine de ce brin. Cependant, cet appauvrissement en Cytosine devrait normalement s'accompagner d'un enrichissement en Thymine équivalent, ce qui n'est pas le cas.

Des études plus récentes considèrent que le biais GC observé est dû au fait que les deux brins sont soumis à des contraintes de mutations différentes. En effet, les ADN polymérases du brin avancé et du brin retardé n'ont pas la même processivité et la même fidélité (Tillier and Collins, 2000). De même, le taux de réparation des erreurs pourrait être aussi différent entre les deux brins (Radman, 1998). Il se pourrait aussi que la surreprésentation des *Chi* et des KOPS, très riches en G, sur le brin avancé puisse contribuer au biais GC (Touzain et al., 2011).

1.3. Structuration du chromosome d'*Escherichia coli* à l'échelle du Kb

Le chromosome d'*E. coli*, s'il était complètement relâché, mesurerait plus d'un mm de long, et occuperait une surface d'environ $200 \mu\text{m}^2$. Sachant qu'en moyenne, une cellule fait $1 \mu\text{m}$ de large sur 2 ou $3 \mu\text{m}$ de long, il est nécessaire que le chromosome soit compacté, 10^3 à 10^4 fois, en une structure nucléoprotéique complexe appelée nucléoïde. Après compaction, le nucléoïde occupe un volume d'environ $0,2 \mu\text{m}^3$ dans une cellule qui fait, quant à elle, environ $1 \mu\text{m}^3$ (Sherratt, 2003). Au sein du nucléoïde, l'ADN en lui-même ne représente qu'environ 5% du volume, le reste étant occupé par les protéines associées à l'ADN, et surtout par du vide.

La compaction du nucléoïde résulte de la condensation du nucléoïde à différents niveaux (de quelques paires de bases et presque 1 Kb), et fait intervenir différents acteurs protéiques tels les NAPs (Nucleoid-Associated Proteins), les protéines de type SMC (Structural Maintenance of Chromosome) ou les protéines de structures des MacroDomaines.

1.3.1. Les NAPs : HU, IHF, FIS, H-NS, Dps...

Les NAPs sont impliquées dans la condensation de l'ADN à une échelle allant d'une dizaine à une centaine de paires de bases. Chez *E. coli*, il existe une dizaine de NAPs différentes qui diffèrent les unes des autres par leur expression au cours des différentes phases du cycle cellulaire ainsi que leur degré de spécificité de séquence. Les NAPs peuvent altérer la topologie de l'ADN, soit en créant des courbures ou des agrégats, soit en pontant deux ADN distants. Les NAPs n'influencent pas seulement la conformation de l'ADN, mais aussi certaines fonctions, comme la recombinaison, la réplication, la réparation de l'ADN et la transcription (Talukder and Ishihama, 1999).

- HU

HU (pour Heat-Unstable Nucleoid Protein) est la NAP la plus conservée chez les bactéries, et la plus abondante dans la cellule (30 000 dimères par cellule en moyenne).

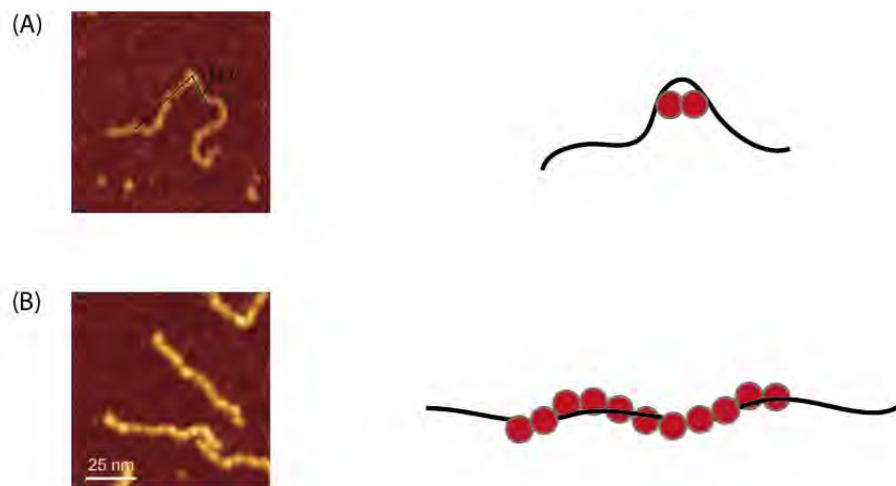


Figure 10 : Effets de la fixation de HU sur la molécule d'ADN

A gauche, images obtenues par microscopie à force atomique (AFM). A droite, représentation schématique de la fixation (A) A faible concentration ($<100\text{nM}$), la fixation d'un dimère de HU induit une courbure de l'ADN pouvant aller jusqu'à former un angle de 160° . Cette activité permet une compaction de l'ADN jusqu'à 50% de sa taille initiale. (B) A forte concentration, HU forme un filament le long de l'ADN, ce qui a pour conséquence une rigidification de l'ADN. A gauche, les images sont obtenues par microscopie à force atomique (AFM) (D'après Van Nort *et al.*, 2004).

C'est une petite protéine (18kDa) dimérique de la famille des protéines de liaison à l'ADN DNA2B (comme IHF), similaire aux histones eucaryotes, se fixant de manière non spécifique sur l'ADN, avec une préférence pour les régions riches en A et T (Prieto et al., 2012) et les supertours négatifs (Shindo et al., 1992). HU est codé par deux gènes (*hupA* et *hupB*) donnant deux protéines différentes HU α et HU β et de ce fait trois formes dimériques différentes : deux homodimères HU α 2 et HU β 2 et un hétérodimère HU $\alpha\beta$. Les différentes formes dimériques ne se lient pas avec la même affinité à l'ADN (Pinson et al., 1999).

L'étude de la fixation d'HU sur la structuration de l'ADN conduit à différents résultats controversés. *In vitro*, la liaison d'HU à l'ADN induit une courbure de 160°, et donc une compaction de la molécule d'ADN (Endo et al., 2002). *In vivo*, HU semble avoir des effets opposés en fonction de la concentration de protéines. A faible concentration (<100nM), la fixation d'HU sous forme de dimères induit la formation de coudes très flexibles qui sont responsables d'une compaction de plus de 50% de l'ADN alors qu'à plus forte concentration, HU forme un filament nucléoprotéique rigide autour de l'ADN, sans induire de condensation significative de l'ADN (van Noort et al., 2004) (Figure 10).

En plus de son rôle structural, HU est impliquée dans la régulation de l'expression de nombreux gènes. L'analyse de l'expression des gènes d'*E. coli* en phase exponentielle, de transition et en phase stationnaire lors d'une délétion de l'un des deux gènes, ou des deux en même temps, a permis l'identification de régulateurs différents pour les trois types de dimères possibles. Ces régulateurs comprennent notamment des gènes impliqués dans le métabolisme énergétique, la réponse SOS et la réponse à différents stress (acide, osmotiques...) (Prieto et al., 2012).

- IHF

IHF (pour Integration Host Factor) a été identifiée dans un premier temps comme un facteur d'intégration du bactériophage *lambda* dans le chromosome d'*E. coli* (Nash and Robertson, 1981). HU et IHF sont très similaires au niveau de leur séquence et de leur structure tridimensionnelle (Oberto et al., 1994).

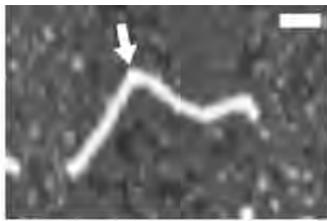


Figure 11 : Effets de la fixation d'IHF sur la molécule d'ADN

A gauche, images obtenues par microscopie à force atomique (AFM). A droite, représentation schématique de la fixation de IHF. Comme HU, IHF se fixe sous forme de dimères sur l'ADN et induit une courbure pouvant atteindre 180°. (D'après Dame *et al.*, 2005)

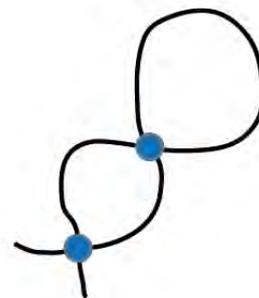
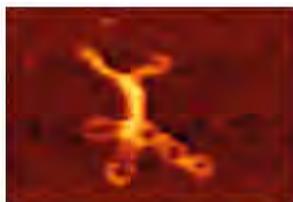


Figure 12 : Effets de la fixation de FIS sur la molécule d'ADN

A gauche, images obtenues par microscopie à force atomique (AFM). A droite, représentation schématique de la fixation. La fixation de FIS induit une courbure entre 50 et 90°. La dimérisation de FIS entraîne la formation de noeud, et permet la stabilisation des boucles d'ADN. (D'après Luijsterburg *et al.*, 2006)

IHF est aussi composée de deux sous-unités homologues, IhfA et IhfB. Contrairement à HU, l'hétérodimère de IHF se lie avec une forte affinité à des séquences d'ADN spécifiques et avec une affinité beaucoup plus faible (avec 1000 à 10000 fois moins d'affinité) à l'ADN non spécifique (Murtin et al., 1998). C'est, à ce jour, la seule NAP décrite possédant un motif consensus de liaison à l'ADN (T/C AANNNTTGA A/T) (Goodrich et al., 1990). Environ 1000 sites de fixation ont été prédits sur le génome d'*E. coli*.

Compte tenu du nombre de sites prédits, du nombre de molécules dans la cellule (entre 8500 et 17000 en phase exponentielle et entre 5 et 6 fois plus en phase stationnaire (Ditto et al., 1994)), et du fait que la majorité des protéines IHF sont liées à l'ADN (S. W. Yang and Nash, 1995), la fixation non spécifique d'IHF, même si elle se fait avec beaucoup moins d'affinité, ne doit pas être négligée. La fixation d'IHF sur l'ADN, qu'elle soit spécifique ou non spécifique, entraîne une courbure de l'ADN, pouvant atteindre 180° (Dame et al., 2005) (Figure 11).

Comme HU, IHF est impliquée dans la régulation de la transcription, la réplication ou la recombinaison. Cependant, HU et IHF diffèrent au niveau de leur degré de conservation chez les bactéries. Alors qu'au moins une des deux sous-unités d'HU est retrouvée chez la grande majorité des génomes bactériens, IHF est beaucoup moins conservée.

- FIS

FIS (pour Factor for Inversion Stimulation) est une petite protéine qui a été mise en évidence pour son rôle dans les inversions catalysées par la recombinase Gin du bactériophage Mu chez *E. coli* (Kahmann et al., 1985), la recombinase à sérine Hin chez *Salmonella typhimurium* (Johnson and Simon, 1985) ou encore la recombinase Cin du bactériophage P1 (Haffter and Bickle, 1987). FIS se fixe avec une haute affinité à certaines régions du chromosome, ce qui a permis de déduire une séquence de fixation de Fis très dégénérée de 15 pb (Hengen et al., 1997). Etant donné le peu de sites à haute affinité trouvés sur le chromosome d'*E. coli* (environ 6000) (Ussery et al., 2001) comparé au nombre de protéines FIS en phase exponentielle de croissance (plus de 50 000 molécules), FIS peut se lier aussi de manière non spécifique à l'ADN, avec une préférence pour les régions courbées (Pan et al., 1996).

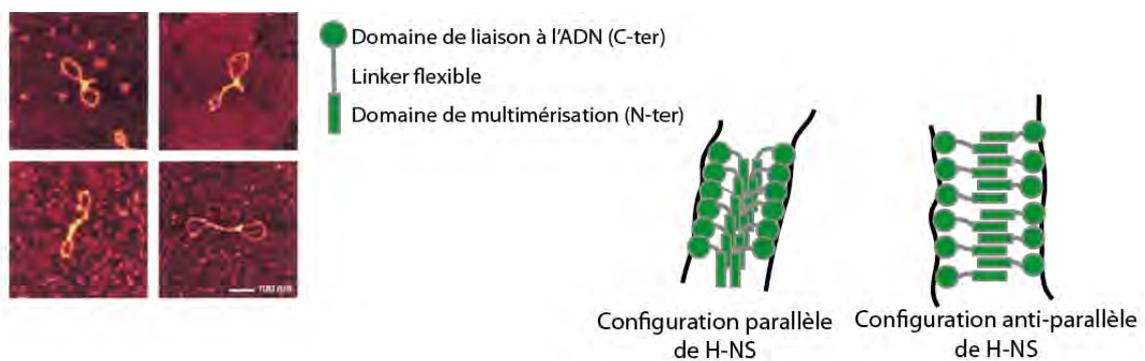


Figure 13 : Effets de la fixation de H-NS sur la molécule d'ADN

A gauche, images obtenues par microscopie à force atomique (AFM). Au milieu, représentation schématique d'un monomère de H-NS avec un domaine de liaison à l'ADN en C-terminal et un domaine de multimérisation en N-terminal, séparés par un linker flexible. A droite, représentation schématique de la fixation de H-NS. La dimérisation de H-NS, que ce soit en configuration parallèle ou anti-parallèle, permet le rapprochement de deux ADN. Ce rapprochement permet la formation et la stabilisation de boucles. (D'après Dame *et al.*, 2006)

La fixation de FIS sur l'ADN entraîne des courbure de 50° à 90°, et de ce fait une compaction de l'ADN, et joue aussi un rôle dans la formation et la stabilisation de boucles d'ADN (Schneider et al., 2001) (Figure 12).

Il est à noter que FIS, en plus de réguler la compaction de l'ADN via la formation de courbure et la stabilisation des boucles, régule aussi la compaction de l'ADN de manière indirecte. En effet, comme HU ou IHF, FIS est un régulateur de l'expression des gènes, et notamment des gènes codant la Gyrase et la TopoI (voir partie 1.3.3.3). En effet, FIS inhibe la transcription des gènes *gyrA* et *gyrB* codant la gyrase (Schneider et al., 1999), et active la transcription du gène *topA* codant la TopoI (Weinstein-Fischer et al., 2000).

- H-NS

H-NS (pour Histone-like Structuring Protein) fut initialement décrite comme un facteur de transcription thermostable (Jacquet et al., 1971). H-NS, petite protéine de 15,4 kDa, se fixe de manière spécifique sur l'ADN, de préférence sur les régions riches en AT présentant une courbure intrinsèque (comme par exemple les séquences avec des répétitions de A qui induisent naturellement une courbure de l'ADN) (Dame et al., 2001). Elle est composée de deux domaines, séparés par un linker flexible. Le domaine C-terminal est un domaine de liaison à l'ADN alors que le domaine N-terminal est impliqué dans la multimérisation de la protéine (Dame et al., 2000). Cette capacité de multimérisation couplée à la capacité de liaison à l'ADN permet la formation de pont entre deux molécules d'ADN distantes et donc la formation de boucles d'ADN ou la stabilisation de boucles existantes (Dame et al., 2000; 2006). De plus, le domaine N-terminal permet une oligomérisation coopérative d'H-NS, permettant de recouvrir une plus grande région d'ADN. Cette oligomérisation peut induire un raccourcissement de 25% de la longueur de l'ADN (Figure 13) (Dame et al., 2000).

Les capacités d'oligomérisation et de formation de boucles sont impliquées dans l'expression de plus de 5% des gènes d'*E. coli* (Hommais et al., 2001). Dans la grande majorité des cas, H-NS agit comme répresseur. Les promoteurs réprimés par H-NS, notamment les promoteurs P1 des opérons ribosomiques, ont comme caractéristique commune d'être flanqués de régions possédant un fort potentiel de courbure.



Figure 14 : Effets de la fixation de Dps sur la molécule d'ADN

A gauche, images obtenues par microscopie à force atomique (AFM). Au milieu, représentation schématique d'un dodécamère de Dps. A droite, les domaines N-terminaux riches en Lysine permettent l'interaction à l'ADN et les interactions entre dodécamères permettent la formation de structure en «fleur». (D'après Ceci *et al.*, 2004)

La fixation de l'ARN polymérase sur ces promoteurs induit un rapprochement de ces régions flanquantes courbées, sur lesquelles H-NS vient préférentiellement se fixer. L'oligomérisation coopérative d'H-NS autour de ces séquences flanquantes va piéger l'ARN polymérase sur ces promoteurs (Dame et al., 2002).

- Dps

Dps (pour DNA-binding Protection from Starved Cells) est très conservée, comme HU. Elle appartient à la famille des bactérioferritines, et présentent des caractéristiques structurales communes avec les autres ferritines bactériennes. Dps s'assemble sous forme de sphère composée de 12 sous-unités identiques. La cavité ainsi créée sert de compartiment de stockage pour le fer (Zhao et al., 2002). Une fois assemblée sous forme de sphère, le dodécamère de Dps est compact et stable, et seul le domaine N-terminal de chaque monomère, riche en lysine, est hautement flexible et est exposé à la surface de la sphère (Calhoun and Kwon, 2011) (Figure 14). Dps ne possédant pas de domaine de liaison à l'ADN, ce sont ces résidus lysine, chargés positivement, qui permettant l'interaction à l'ADN, chargé négativement.

La liaison des dodécamères à l'ADN induit des interactions entre plusieurs dodécamères de Dps, ce qui conduit à la formation d'une structure hautement ordonnée et stable, en forme de nid d'abeille (Figure 14), dans laquelle l'ADN est condensé et protégé des dommages extérieurs tels les stress oxydatifs, les UV, les radiations gamma... La protection induite par Dps lors de tels stress n'est pas uniquement une protection physique du fait de la formation d'une structure hautement compacte, mais aussi une protection chimique, notamment grâce à la séquestration et à l'oxydation des ions Fe^{2+} à l'intérieur des sphères, évitant ainsi la formation de radicaux libres dans le cytoplasme, et donc la survenue de cassures simple ou double brins de l'ADN par oxydation (Zhao et al., 2002).

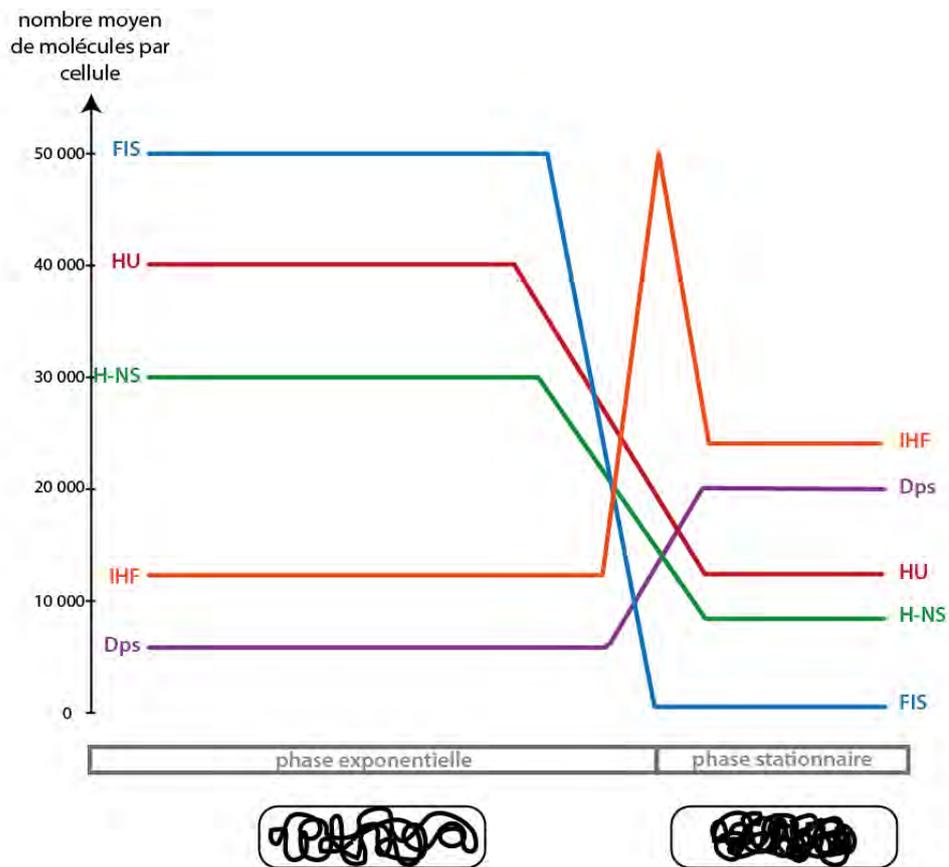


Figure 15 : Répartition des NAPs en fonction des phases de croissance

Le niveau de condensation du nucléoïde est différent en fonction des phases de croissance. Cela est dû à une répartition différente des NAPs. En phase exponentielle de croissance, les NAPs les plus abondantes sont Fis, HU et H-NS. En phase stationnaire, Fis est quasi absente, et les NAPs les plus abondantes sont IHF et Dps.

- Expression différentielle des NAPs au cours des différentes phases de croissance

Les NAPs interviennent dans la structuration du chromosome d'*E. coli*, mais aussi dans la régulation de nombreux processus cellulaires comme la transcription, la réplication ou la recombinaison. Ces différentes activités sont modulées en fonction des phases de croissance via des variations de la concentration cellulaire des différentes NAPs (Figure 15).

En phase stationnaire, le nucléoïde est plus compact qu'en phase expo (Sato et al., 2013). L'aire moyenne du nucléoïde, après isolement et fixation au glutaraldehyde, à différentes phases de croissance, a été étudiée en microscopie à fluorescence. Cette étude a permis de mettre en évidence une diminution d'un facteur deux de l'aire du nucléoïde entre la phase exponentielle (aire moyenne de $2,2\mu\text{m}^2$) et la phase stationnaire ($1,3\mu\text{m}^2$) (Talukder and Ishihama, 2015). Ce changement de compaction du nucléoïde s'accompagne d'un changement de concentration des différentes NAPs.

En phase exponentielle de croissance, la NAP la plus abondante est Fis, avec une moyenne de 50 000 molécules par cellule. Les protéines HU et H-NS sont, elles aussi, très abondantes en phase exponentielle (30 à 50 000 molécules pour HU, 20 000 molécules pour H-NS). A l'inverse, Dps et IHF sont peu abondantes durant cette phase (12000 molécules pour IHF et moins de 7 000 molécules pour Dps) (Talukder and Ishihama, 1999) (Figure 15).

Lors du passage en phase stationnaire, il y a augmentation rapide de la concentration en IHF, avec un pic à environ 50 000 molécules, puis diminution de moitié de la concentration et stabilisation de la concentration (environ 25 000 molécules par cellule). De plus, Dps, qui était très peu abondante en phase exponentielle devient très abondante, avec 18 000 molécules par cellule en moyenne. Cette abondance de Dps est cruciale pour la structuration hautement ordonnée et compacte du nucléoïde, et donc pour la protection contre les stress environnementaux (Ceci et al., 2004; Wolf et al., 1999). A l'inverse, on observe une diminution importante de la concentration en HU et H-NS (diminution de plus d'1/3 pour HU et de moitié pour H-NS) et une disparition quasi totale de Fis (moins de 100 molécules par cellule), qui était, en phase exponentielle la NAP la plus abondante (Figure 15) (Talukder and Ishihama, 1999).

Il est à noter que, pendant la phase exponentielle, Fis et H-NS répriment de façon sélective le promoteur du gène *dps*, en empêchant la transcription par l'ARN polymérase contenant le facteur sigma 70 (facteur sigma de ménage pendant la phase exponentielle) mais pas la transcription par l'ARN polymérase contenant le facteur sigma S (facteur sigma le plus abondant pendant la phase stationnaire). Cette répression sélective est à l'origine de l'absence de Dps en phase exponentielle lorsque Fis est très abondant, et de l'augmentation de Dps en phase stationnaire, lorsque Fis disparaît et que le facteur sigma le plus abondant change, levant l'inhibition par H-NS (Grainger et al., 2008).

Pour résumer, la structuration du nucléoïde pendant la phase exponentielle est principalement assurée par Fis, mais aussi par HU et H-NS, la transition phase exponentielle/phase stationnaire est assurée par IHF et enfin le haut niveau de compaction de nucléoïde pendant la phase stationnaire est principalement sous le contrôle de Dps.

1.3.2. MukBEF

Les protéines de type SMC (pour Structural Maintenance of Chromosome) sont, sauf rares exceptions, ubiquitaires chez les bactéries, les archae et les eucaryotes. Chez les eucaryotes, la famille des SMC inclut différentes protéines, notamment des condensines et des cohésines (Losada and Hirano, 2005). Chez les bactéries, seules trois familles de condensines ont été répertoriées comme appartenant à la famille des SMC : la famille des condensines SMC-ScpAB (Britton et al., 1998) que l'on retrouve chez la majorité des bactéries, la famille des condensines MukBEF que l'on retrouve principalement chez les entérobactéries et quelques autres γ -protéobactéries (Niki et al., 1991), et enfin la famille des condensines MksBEF (MukBEF-like SMCs) retrouvée chez diverses protéobactéries (Petrushenko et al., 2011). Ici, nous nous focaliserons uniquement sur le complexe MukBEF car c'est le seul complexe de type SMC présent chez *E. coli*.

Les trois sous-unités du complexe MukBEF sont codées par l'opéron *smtA-mukF-mukE-mukF*. La fonction de la protéine SmtA est à l'heure actuelle inconnue, elle présente des similarités de séquences avec la famille des méthyltransferases S-adenosylmethionine dépendante (Yamanaka et al., 1995).

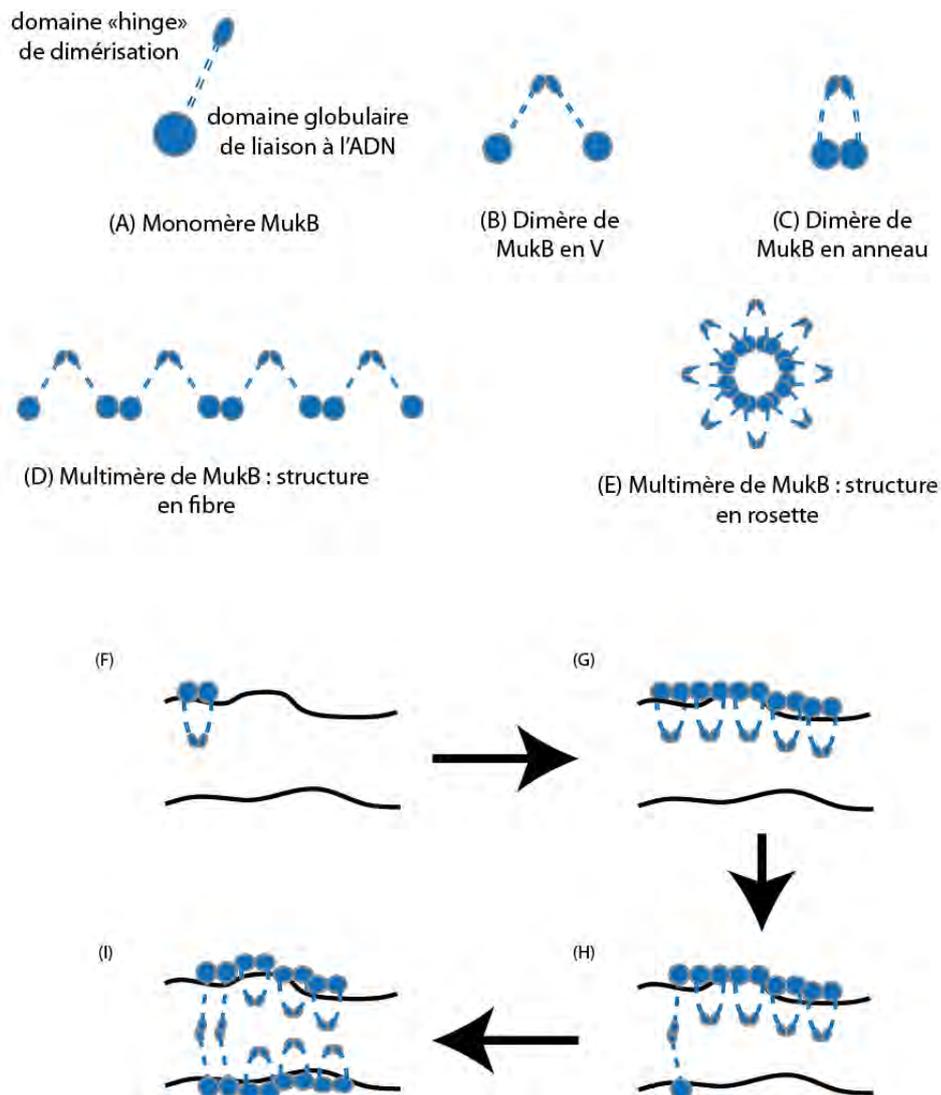


Figure 16 : Fixation de MukB sur l'ADN

(A) MukB est composée de deux domaines globulaires en N-ter et en C-ter séparés par deux longues hélices α et un domaine «hinge». Les deux domaines globulaires s'associent pour ne former qu'un seul domaine de liaison à l'ADN. Le domaine «hinge» permet la dimérisation de MukB. Les dimères de MukB peuvent être en forme de V (B) ou d'anneau (C). Les domaines globulaires permettent la dimérisation du MukB et donc la formation de structure de type fibre (D) ou rosette (E). (F) La fixation de MukB se fait de manière coopérative. La fixation d'un premier dimère est une étape lente et réversible. (G) La propagation de MukB le long de l'ADN se fait rapidement et conduit à la formation d'une structure stable. (H) L'étape de pontage est indépendante de l'étape de propagation. La collision aléatoire permet la formation d'un premier pont peu stable entre deux ADN. (I) La propagation de MukB ainsi que la formation de ponts supplémentaires stabilisent le pontage entre deux ADN distants. (D'après Petrusenko *et al.*, 2010)

MukB est composée de deux domaines globulaires en N-terminal et en C-terminal, séparés par deux longues hélices α et un troisième petit domaine globulaire entre les deux hélices servant de charnière (domaine « *hinge* ») (Figure 16) (Niki et al., 1992). Les domaines N- et C-terminal, qui contiennent les motifs Walker A et B respectivement, se replient de sorte à ne former qu'un seul domaine globulaire, avec le site de liaison à l'ATP exposé à sa surface (Woo et al., 2009). Le domaine « *hinge* » permet la dimérisation de MukB. La conformation en V, avec les deux long bras « coil-coiled » et les deux domaines globulaires au bout de ces bras, est caractéristique des protéines de type SMC, eucaryotes comme procaryotes. L'angle entre les deux monomères peut varier de 0 à 180° (Melby et al., 1998; Niki et al., 1992). Les deux domaines globulaires aux extrémités du V peuvent se regrouper et former un site de liaison à l'ADN et un site d'hydrolyse de l'ATP (Hirano, 2002; Woo et al., 2009). Ce regroupement peut conduire à la formation d'une structure en anneau (Figure 16). La liaison des deux co-facteurs MukE et MukF (sous forme d'hétérotétramère) aux domaines globulaires de MukB augmente l'affinité des domaines globulaires entre eux, et donc la fréquence de formation de structures en anneaux (Matoba et al., 2005). Le complexe MukEF module aussi les interactions MukB-ADN (Cui et al., 2008). Le complexe MukBEF ainsi formé peut aussi multimériser via les domaines globulaires permettant une fixation coopérative et pouvant conduire à la formation d'une forme multimérique fibreuse ou à la formation d'une rosette (Figure 16) (Matoba et al., 2005).

MukB se lie aussi bien à l'ADN linéaire qu'à l'ADN circulaire, avec seulement une préférence pour l'ADN super-enroulé (Petrushenko et al., 2006). La fixation de MukB sur l'ADN est hautement coopérative. La fixation du premier dimère de MukB sur l'ADN est une étape lente, et réversible très rapidement (= étape de nucléation). Par contre, une fois cette étape effectuée, la propagation du cluster de MukB le long de l'ADN grâce à la fixation coopérative se fait très rapidement (= étape de propagation) (Cui et al., 2008) (Figure 16). La formation de pont par MukB est une étape indépendante de la fixation sur l'ADN (Petrushenko et al., 2010). Comme pour l'étape de nucléation, la fixation d'un premier MukB sur l'ADN nu est peu stable, mais le pontage va être stabilisé par la propagation coopérative de MukB sur l'ADN nu (Petrushenko et al., 2010).

La déformation directe de l'ADN via la fixation d'un cluster de MukB ainsi que le pontage de deux ADN distants participent à la condensation de l'ADN. En effet, l'inactivation de MukBEF provoque une désorganisation du chromosome, un changement de superhélicité de l'ADN plasmidique et chromosomique et une décondensation de l'ADN. De plus, il y a augmentation de la fréquence d'apparition de cellules annuclées chez ces mutants, et ces mutants présentent une baisse de viabilité lorsqu'ils sont cultivés à plus de 25°C (Niki et al., 1991; Weitao et al., 2000; Yamanaka et al., 1996). De plus, les mutations dans le gène *topA* (gène codant la TopoI, voir partie 1.3.3.3), induisant une augmentation de la superhélicité négative, suppriment la thermosensibilité des mutants *mukB* (Sawitzke and Austin, 2000), indiquant que cette thermosensibilité est due à la décondensation du chromosome en absence du complexe MukBEF.

MukB est aussi impliqué dans d'autres processus cellulaires qui seront abordés plus loin dans ce manuscrit. MukB est notamment impliquée, avec SeqA, dans la cohésion post-réplivative (voir partie 2.5.1) (Zawadzki et al., 2015). De plus, MukB interagit avec MatP, et cette interaction joue un rôle dans le positionnement du chromosome et la régulation de l'activité de la TopoIV (voir partie 3.1.3.3) (Nolivos et al., 2016).

1.3.3. Topologie de l'ADN

L'organisation du chromosome d'*E. coli* en nucléoïde est dépendant de la présence des NAPs et de MukB, mais aussi du surenroulement négatif de la molécule d'ADN. En effet, au sein de nucléoïde, l'ADN est surenroulé négativement, avec une densité moyenne d'un supertour négatif pour 200 paires de bases (Stonington and Pettijohn, 1971; Worcel and Burgi, 1972). Nous verrons dans cette partie que le surenroulement négatif de la molécule d'ADN est contraint au sein de domaines topologiques, et que la topologie de l'ADN est altérée par différents processus cellulaires, et régulée par les topoisomérases.

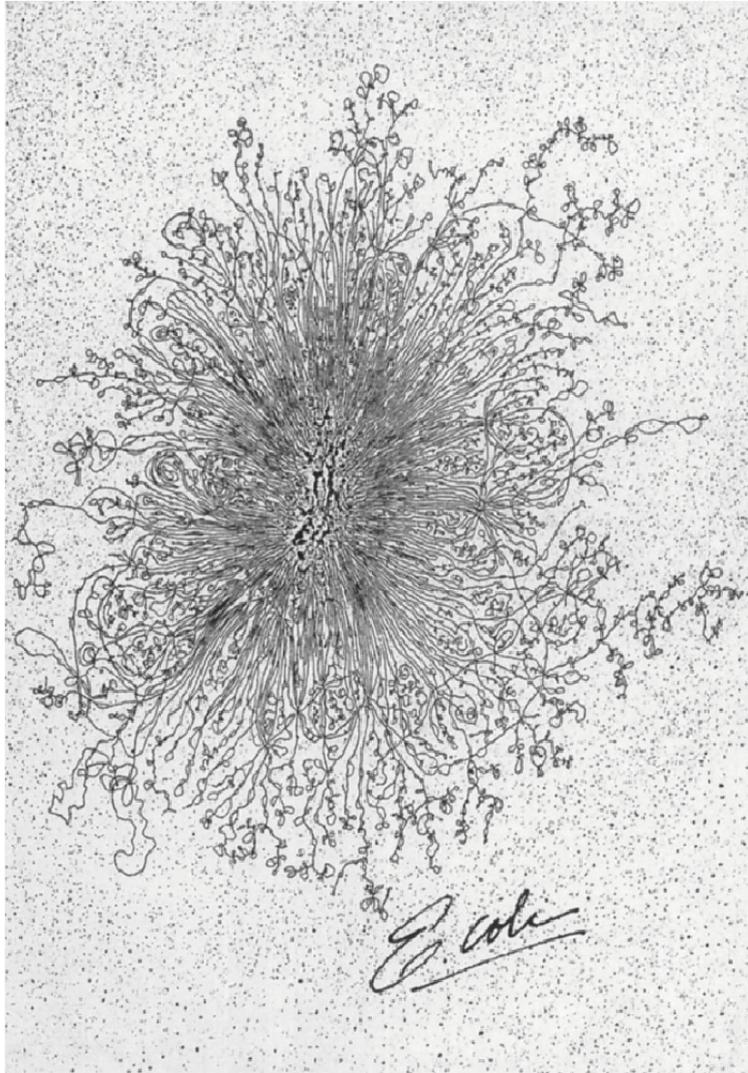


Figure 17 : Nucléoïde d'*E. coli* en microscopie électronique

Le nucléoïde d'*E. coli* isolé in vitro, présente une organisation en rosette, avec des boucles d'ADN superenroulés qui rayonnent autour d'un noyau central, plus condensé, contenant les ARN. (D'après Kavenoff and Bowen, 1976)

1.3.3.1. Les domaines topologiques

L'observation en microscopie électronique, en 1976, du nucléoïde d'*E. coli* isolé *in vitro*, a permis de mettre en évidence une organisation en rosette, avec des boucles d'ADN superenroulées qui rayonnent autour d'un noyau central, plus condensé, contenant les ARN (Figure 17) (Kavenoff and Bowen, 1976). Ces premières observations ont permis de dénombrer entre 65 et 200 domaines topologiques, mais ce nombre était sous-estimé, les conditions de lyse utilisées ne permettant pas la libération de toutes les boucles d'ADN.

En 1981, une première étude *in vivo* a permis de mettre en évidence la présence des domaines topologiques et de les compter. La densité de superhélicité négative a été mise en évidence via l'utilisation de triméthylpsoralène, un agent intercalant de l'ADN qui cible préférentiellement les régions denses en superhélicité et qui, après irradiation aux UV crée des pontages sur l'ADN. Le nombre de pontage est donc proportionnel à la densité de superhélicité. Ensuite, la quantification du nombre de coupures monocaténaïres nécessaire au relâchement total de la molécule d'ADN a permis de mettre en évidence le confinement de la superhélicité au sein d'une cinquantaine de domaines topologiques d'environ 100 Kb (Sinden and Pettijohn, 1981). Les domaines topologiques sont des domaines indépendants dans lesquels les stress topologiques sont confinés, ce qui implique l'existence de barrières entre ces domaines, empêchant la diffusion de la superhélicité d'un domaine topologique à l'autre.

Partant du constat que chez *Salmonella enterica*, les domaines topologiques sont plus petits (environ 25 Kb) et plus nombreux (entre 40 et 150) que les estimations précédentes, et surtout variables en taille et en emplacement (Higgins et al., 1996), une nouvelle étude a été faite sur le chromosome d'*E. coli*, combinant des approches *in vivo* et *in vitro*. La première approche consiste à dénombrer et mesurer les boucles d'ADN après purification de nucléoïdes et observation au microscope électronique. Avec cette approche, le nombre moyen de boucles est estimé à 169, avec une taille comprise entre 10 et 13 Kb. La seconde approche est basée sur l'identification de plus de 300 gènes répartis sur le chromosome, dont l'expression est sensible à la topologie (Peter et al., 2004). Ces gènes ont été utilisés pour mesurer le relâchement de la superhélicité négative induit par une coupure double brin d'ADN.

L'analyse de l'expression de ces gènes en fonction de l'emplacement de la coupure double brin suivi d'un traitement statistique a permis de mettre en évidence la présence d'environ 400 domaines topologiques, dont la taille, légèrement variable, fait en moyenne 10 Kb et dont les limites ne sont pas fixes (Postow et al., 2004). Ainsi chaque chromosome est compacté différemment en domaines topologiques en fonction de la phase de croissance, de la réplication, de l'expression de certains gènes, de l'état métabolique de la cellule.... L'utilisation d'outils permettant d'induire de la superhélicité positive et de suivre sa diffusion a permis de mettre en évidence que les 71 séquences BIME-2 (voir partie 1.2.2.1) qui portent un site de fixation pour la Gyrase (voir partie 1.3.3.3) empêchent la propagation de la superhélicité positive lors de la transcription (donc lors de l'ouverture de la double hélice d'ADN) (Moulin et al., 2005). Ces sites agissent donc comme des barrières (insulateurs) topologiques limitant la diffusion de la superhélicité d'un domaine topologique à un autre.

La segmentation du nucléoïde en nombreux domaines topologiques de petite taille confère de nombreux avantages à la cellule. (i) Lorsqu'il y a cassure simple ou double brin de l'ADN, les modifications de topologies induites ne se propagent pas à l'ensemble du chromosome, mais uniquement au niveau du domaine topologique. (ii) Sachant que l'expression des gènes est très souvent dépendante de la superhélicité de l'ADN, le passage de la fourche de réplication va induire des perturbations dans le niveau d'expression des gènes à proximité. Mais comme les domaines topologiques font environ 10 Kb et que la machinerie de réplication avance à une vitesse d'environ 1 Kb par seconde, l'expression des gènes ne devrait être perturbée que d'environ 10 secondes par le passage de la fourche de réplication. (iii) Les domaines topologiques permettant aussi de faciliter les réparations des cassures doubles brins d'ADN en maintenant les extrémités libres à proximité l'une de l'autre.

1.3.3.2. Altération de la topologie de l'ADN

La présence de domaines topologiques contraint les modifications topologiques mais ne peut les éviter. Tous les processus cellulaires (réparation des cassures, réplication, recombinaison, transcription, transposition) sont influencés et/ou influent sur la topologie de l'ADN, en introduisant des boucles, des nœuds ou via l'ouverture de la double hélice d'ADN.

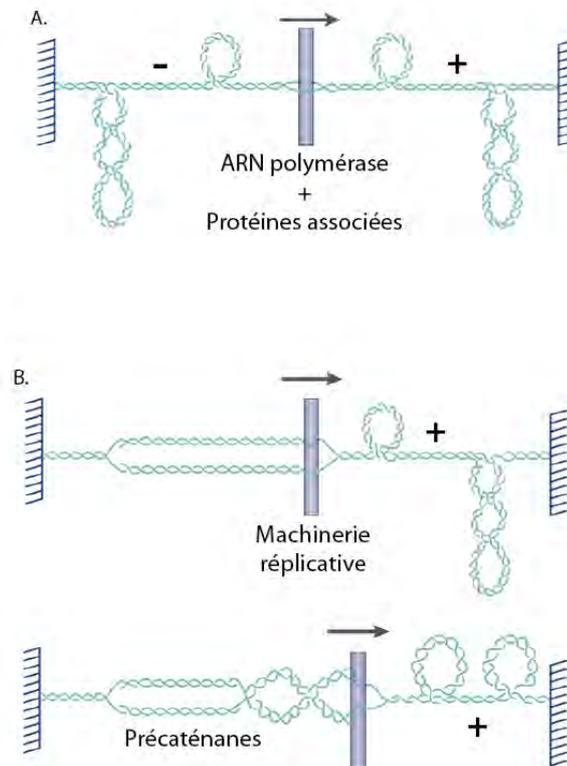


Figure 18 : Altération de la topologie de l'ADN lors de la transcription et de la réplication

(A) Lors de la transcription, la progression de la machinerie de transcription induit la formation de supertours positifs en aval. Une partie de cette contrainte diffuse à travers la machinerie de transcription, entraînant la formation de supertours négatifs en amont. (B) Lors de la réplication, si la machinerie répliquative est immobile, il y a accumulation de supertours positifs en aval. Par contre, si la machinerie répliquative peut tourner autour de l'axe de l'hélice d'ADN, il va y avoir, en plus de l'accumulation de supertours positifs en aval, formation de précaténanes en amont. (D'après Wang *et al.*, 2002)

Toute ouverture de la double hélice entraîne des torsions topologiques. La réplication et la transcription sont les deux événements générant le plus de contraintes topologiques.

Dans le cas de la transcription, l'ouverture par des hélicases et la progression de l'ARN polymérase entraîne l'accumulation de supertours positifs en aval. Afin de permettre la progression de l'ARN polymérase, une partie des contraintes diffuse à travers la machinerie de transcription, ce qui entraîne la formation de supertours négatifs à l'arrière de l'ARN polymérase (Figure 18A) (Liu and Wang, 1987). Bien que la transcription soit moins rapide que la réplication, elle affecte très fortement la topologie de l'ADN, compte tenu du fait qu'elle est bien plus fréquente.

En ce qui concerne la réplication de l'ADN, l'ouverture par les hélicases de la double hélice d'ADN et la progression de machinerie de réplication entraîne, comme pour la transcription, une accumulation de supertours positifs en aval. Et comme cette accumulation peut entraîner l'arrêt de la réplication, une partie des contraintes bascule à l'arrière de la fourche de réplication, provoquant l'entrelacement de deux brins d'ADN nouvellement répliqués. Cet entrelacement est appelé précaténanes (Figure 18B) (Liu and Wang, 1987).

1.3.3.3. Régulation de la topologie de l'ADN

Malgré les changements de topologie induits par les processus cellulaires, il est essentiel que le niveau global de superhélicité globale reste le même au cours du cycle cellulaire. Les changements de superhélicité ont de nombreuses conséquences pour la cellule. Par exemple, une augmentation de la superhélicité négative crée des structures d'ADN aberrantes (R-loop, triplex d'ADN) (Drolet et al., 2003) alors qu'une diminution de la superhélicité négative entraîne des défauts de ségrégation des chromosomes frères et la mort cellulaire (Hiraga et al., 1989). Les topoisomérases sont des enzymes essentielles à la régulation de la topologie de l'ADN. Elles sont capables de modifier la topologie de l'ADN par clivage d'un seul brin (topoisomérases de type I) ou des deux brins d'ADN (topoisomérases de type II) (Champoux, 2001).

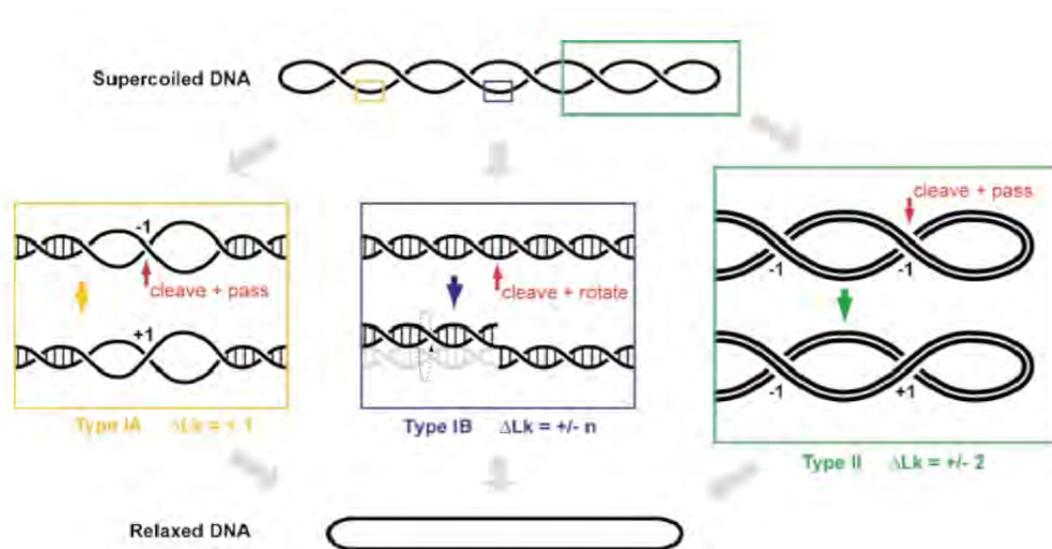


Figure 19 : Activités des différentes topoisomérases

La superhélicité de l'ADN peut être modifiée par les topoisomérases. Les Topo de types IA catalysent le passage d'un brin du duplex d'ADN à travers le second, ce qui augmente le Lk d'un facteur 1 (carré jaune). Les Topo de type IB clivent un brin du duplex et permettent la rotation du duplex autour du brin intact, ce qui modifie le Lk de +/- n (carré violet). Les Topo de type II catalysent le passage d'un duplex d'ADN à travers un autre duplex, ce qui change le Lk d'un facteur 2 (carré vert). (D'après Corbett and Berger, 2004)

Chez *E.coli*, il y a deux topoisomérases de type I (la TopoI et la TopoIII), et deux topoisomérases de type II (la Gyrase ou TopoII et la TopoIV) (Wang, 2002). Quel que soit la famille, les topoisomérases présentent de nombreux points communs : une structure en forme de pince permettant les activités de coupure et de transfert de brins, une tyrosine catalytique permettant le clivage et la formation d'une liaison covalente avec l'une des extrémités clivées et une cavité permettant le stockage transitoire des fragments d'ADN.

- Les Topoisomérases de type I

Les topoisomérases de type I, qui sont quasiment exclusivement monomériques, coupent un seul brin d'ADN. Il existe deux familles de topoisomérases de type I. (i) Les topoisomérases de type IA forment une liaison covalente avec l'extrémité 5' phosphate de l'ADN, transfèrent l'autre brin de manière ATP-indépendante, et referment la coupure. Cette activité permet de modifier le « Linkage number » (= Lk ou nombre de liens ; ce terme est un entier qui correspond au nombre d'entrelacement entre les deux brins d'une molécule d'ADN, et donc au nombre minimal de passage d'un brin à travers l'autre nécessaire à leur séparation) d'un facteur 1 ($\Delta Lk=+1$) (Figure 19). Les Topo IA sont capables de relâcher les supertours négatifs. (ii) Les topoisomérases de type IB forment une liaison avec l'extrémité 3' phosphate de l'ADN et permettent au brin coupé de tourner librement autour du brin intact, ce qui permet de modifier le Lk d'un facteur n ($\Delta Lk=+/-n$). Les Topo IB sont capables de relâcher à la fois les supertours positifs et négatifs (Gómez-Eichelmann and Camacho-Carranza, 1995).

Parmi les topoisomérases de type IA, on retrouve la TopoI et la TopoIII d'*E. coli*. Concernant les topoisomérases de type IB, on ne compte aucune topoisomérase bactérienne dans cette famille. La présence ubiquitaire des topoisomérases de type IA chez tous les organismes vivants suggère qu'elles ont un rôle cellulaire clef et qu'elles ne peuvent être remplacées dans leurs fonctions par d'autres topoisomérases de type IB ou de type II. Le fait que la viabilité cellulaire soit compromise lors d'une inactivation des deux topoisomérases de type IA chez *E. coli* conforte cette idée (Zhu et al., 2001).

- La TopoI

La TopoI d'*E. coli* a été la toute première enzyme identifiée permettant de changer le nombre de liens topologiques de l'ADN (Wang, 1971). Elle est codée par le gène *topA* et permet de relâcher les supertours négatifs en excès. Lorsque *topA* est délétée, on observe l'apparition de mutations compensatoires secondaires dans les gènes *gyrA* et *gyrB*, codant pour la Gyrase. Ces mutations conduisent à la production d'une Gyrase avec une activité d'introduction de supertours négatifs diminuée (DiNardo et al., 1982; McEachern and Fisher, 1989; Oram and Fisher, 1992; Pruss et al., 1982). Cette adaptation permet de compenser l'absence de la TopoI en évitant l'accumulation de supertours négatifs. Cette accumulation a pour conséquence la formation de structure de type R-loop pouvant entraîner une inhibition de la croissance cellulaire. La TopoI est donc essentielle à la régulation de la superhélicité globale du chromosome (Drolet et al., 1995; Massé and Drolet, 1999a; 1999b).

- La TopoIII

La TopoIII est, quant à elle, codée par le gène *topB*. La TopoIII se lie préférentiellement à l'ADN simple brin, ce qui fait d'elle une puissante décaténase pour les ADN circulaires ayant un trou monocaténaire (un « *gap* ») (DiGate and Marians, 1988; Hiasa et al., 1994). La TopoIII permet le passage d'un ADN double brin à travers la coupure d'un ADN simple brin (Seol et al., 2013). Comparé à la TopoI, la TopoIII est une bien meilleure décaténase, mais est bien moins efficace pour le relâchement de la superhélicité négative. Elle ne participe donc pas à la régulation de la superhélicité globale du chromosome.

Bien que l'absence de TopoIII n'entraîne pas une accumulation de caténanes, la surexpression de la TopoIII peut suppléer une inactivation partielle de la TopoIV grâce à sa capacité à résoudre les précaténanes (Hiasa and Marians, 1994; Nurse et al., 2003). Une étude récente montre que la TopoIII joue un rôle dans la ségrégation ordonnée et efficace du chromosome lors d'une inactivation partielle de la TopoIV. En effet, l'équipe de Ken Marians a montré que la délétion de *topB* est synthétiquement létale, à température permissive, avec les mutants thermosensibles de la TopoIV. De plus, les mutants de *topB* sont hypersensibles aux inhibiteurs de topoisomères de type II, dont fait partie la TopoIV (Perez-Cheeks et al., 2012).

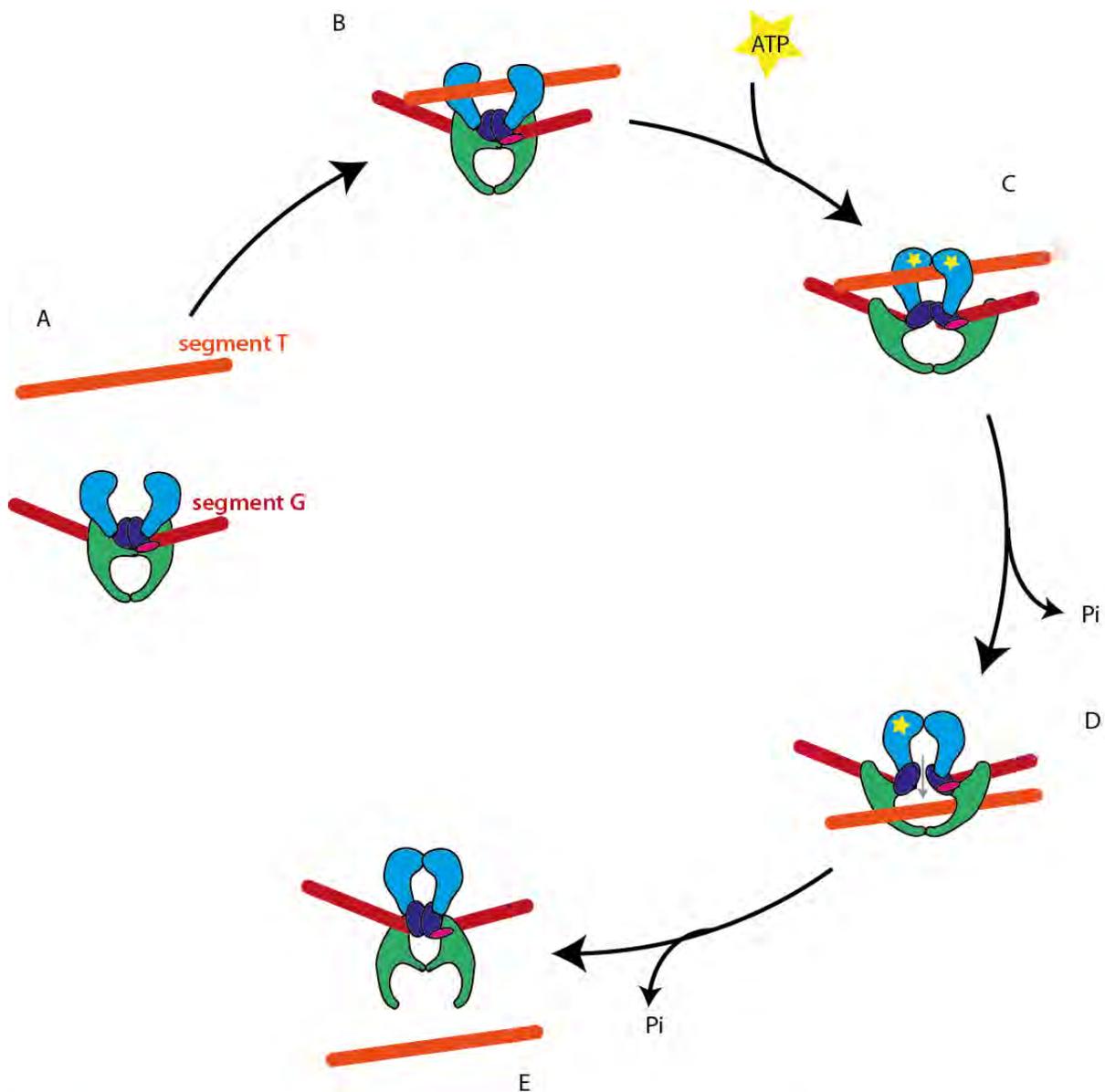


Figure 20 : Mécanisme d'action des topoisomérases de type II

En bleu, le domaine ATPase (ParE ou GyrB) ; en violet, le domaine TOPRIM ; en vert, le domaine catalytique (ParC ou GyrA) ; en rose, le domaine 5Y-CAP. (A) La Topo lie un premier segment d'ADN (segment G) via les domaines TOPRIM et 5Y-CAP. (B) Le second segment d'ADN (segment T) est positionné au niveau des domaines ATPase. (C) La fixation de 2 ATP entraîne un changement de conformation et la sequestration du segment T. (D) L'hydrolyse d'un ATP permet le clivage du segment G et le passage du segment T à travers la coupure. (E) L'hydrolyse d'un second ATP permet la religation du segment G et la libération des deux segments T et G grâce à un dernier changement conformationnel (D'après Corbet and Berger, 2004)

- Les Topoisomérases de type II

Les topoisomérases de type II, qui sont toujours sous forme de dimères ou de tétramères, sont capables de cliver les deux brins de la molécule d'ADN, et de transférer, à travers la coupure, une double hélice d'ADN, provenant de la même molécule d'ADN, ou d'une autre molécule d'ADN. Cette réaction, nécessitant de l'ATP, permet de modifier le Lk d'un facteur 2 ($\Delta Lk = +/-2$) (Figure 19). Les topoisomérases de type II permettent le relâchement de la superhélicité, mais aussi la caténation/décaténation et l'introduction de supertours.

Comme les topoisomérases de type I, les topoisomérases de type II sont subdivisées en deux sous-familles : les Topo de type IIA et IIB. Avant la découverte de la première Topo de type IIB chez l'archae *Sulfolobus shibatae* (la TopoVI) (Bergerat et al., 1997), toutes les topoisomérases de type II appartenait à la même sous-famille. On sait maintenant que les Topo de type IIA et IIB sont largement répandues. D'un point de vue mécanistique, il y a de nombreuses ressemblances entre les Topo de type IIA et IIB. La classification dans l'une ou l'autre des sous-familles est principalement basée sur la structure des topoisomérases (Nichols et al., 1999). Chez *E. coli*, les deux topoisomérases de type II, la Gyrase et la TopoIV, appartiennent à la sous-famille des Topo de type IIA. Ce sont deux protéines homologues, possédant des mécanismes d'action très similaires.

- Mode d'action des topoisomérases de type II

Les deux topoisomérases sont hétérotétramériques. Elles sont composées de deux sous-unités ATPasiques (GyrB et ParE) et de deux sous-unités catalytiques (GyrA et ParC). Les sous-unités ATPasiques contiennent le site de fixation à l'ATP ainsi que le domaine TOPRIM (domaine catalytique Mg^{2+} -dépendant). Les sous-unités catalytiques présentent un domaine globulaire de liaison à l'ADN en C-terminal et un domaine 5Y-CAP dans lequel se situe la Tyrosine catalytique (pour revue ; Champoux, 2001).

La double hélice qui va être clivée, appelée double hélice G (G pour « Gate »), se lie aux domaines catalytiques TOPRIM et 5Y-CAP. La fixation de deux molécules d'ATP au niveau du domaine ATPasique entraîne un changement de conformation de ce domaine.

Cela permet la capture de l'autre hélice d'ADN, appelée hélice T (T pour « *Transfert* ») ainsi que la coupure de l'hélice G (nécessite l'hydrolyse d'un ATP). L'hélice T est transférée à travers la coupure. Enfin, l'hélice G est religaturée et les deux hélices sont libérées (nécessite l'hydrolyse d'un ATP) (Figure 20). Si les deux doubles hélices G et T font partie de la même molécule d'ADN, cette réaction va entraîner une modification du Lk d'un facteur 2 ($\Delta Lk=2$) (Figure 19). Par contre, si les deux doubles hélices G et T appartiennent à deux molécules d'ADN indépendantes, la réaction entraînera une caténation ou une décaténation de ces deux molécules (pour revue ; Champoux, 2001).

- [La Gyrase](#)

La Gyrase est la première topoisomérase de type II à avoir été identifiée (Gellert et al., 1976). Elle est la seule topoisomérase capable d'introduire de la superhélicité négative dans l'ADN. L'introduction de supertours négatifs est nécessaire à l'initiation de la réplication et de la transcription car cela favorise énergétiquement l'ouverture de la double hélice d'ADN (Zechiedrich et al., 2000). En plus de cela, elle peut aussi relâcher la superhélicité positive qui se crée devant la fourche de réplication ou la fourche de transcription, et est donc essentielle à la progression de la transcription et de la réplication (Liu and Wang, 1987). Concernant la décaténation des chromosome, la Gyrase ne semble pas intervenir directement dans la décaténation, mais l'introduction de supertours négatifs dans l'ADN pourrait favoriser la décaténation par la TopoIV en créant un meilleur substrat pour celle-ci (voir plus loin) (Zechiedrich et al., 1997).

La Gyrase est donc essentielle au bon déroulement de la réplication et de la transcription et la délétion de l'un ou l'autre des gènes codant pour l'une ou l'autre des sous-unités est létale. En effet, l'incubation à température permissive de mutants *gyrA* thermosensibles provoque un arrêt de la réplication, entraînant la mort cellulaire (Kreuzer and Cozzarelli, 1979).

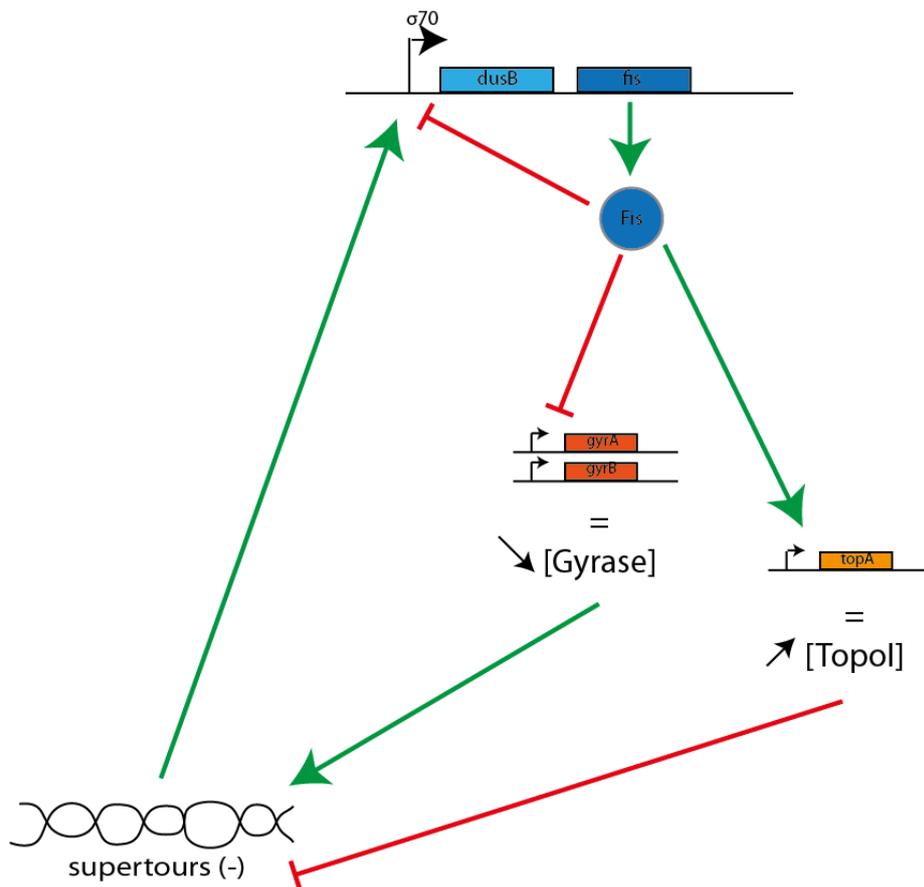


Figure 21 : Régulation du niveau de superhélicité positive par Fis, la Gyrase et la TopoI

Le niveau de régulation de supertours négatifs dans la cellule est finement contrôlé grâce au contrôle de la concentration de Gyrase, qui permet l'ajout de supertours négatifs et de la concentration de TopoI, qui permet d'enlever les supertours négatifs. Cette boucle de régulation fait intervenir la NAPs Fis qui inhibe la transcription des gènes *gyrA* et *gyrB* et qui active la transcription de *topA*. La transcription de *fis* est dépendante du niveau de superhélicité négative dans la cellule, et de la présence de Fis.

- Régulation de l'expression de la Gyrase

La Gyrase, comme la TopoI, participe au maintien et à la régulation du niveau de superhélicité négative du chromosome. Il est intéressant de noter que les promoteurs des gènes *topA*, *gyrA* et *gyrB* sont tous les trois indirectement sensibles à la superhélicité. Ils sont tous les trois régulés par Fis (voir partie 1.3.1), et la transcription de *fis* est sensible au niveau de superhélicité. En effet, le promoteur de *fis* est caractérisé par la présence d'une séquence riche en GC entre la boîte -10 et le site d'initiation. Cette séquence est appelée discriminateur et crée une barrière énergétique pour l'ouverture de la double hélice et donc l'initiation de la transcription. Pour que l'ouverture soit possible, il faut un niveau élevé de superhélicité négative (Walker et al., 1999). Donc, lorsque le niveau de superhélicité négative est élevé, il y aura production de Fis. Fis (i) réprime son propre promoteur (présence de 6 sites de fixation pour FIS dans la région promotrice), (ii) réprime la transcription de *gyrA* et *gyrB* (et donc diminue la production de la Gyrase qui permet d'introduire des supertours négatifs) et (iii) active la transcription de *topA* (et donc augmente la production de la TopoI, qui permet le relâchement des supertours négatifs) (Figure 21) (Schneider et al., 1999; Weinstein-Fischer et al., 2000). A l'inverse, lorsque le niveau de superhélicité négative est faible au niveau du promoteur *fis*, il y aura peu de synthèse de FIS et donc une levée de l'inhibition des promoteurs *gyrA* et *gyrB*, permettant la production de la Gyrase et donc l'introduction de supertours négatifs dans la molécule (Figure 21). Cette boucle de régulation permet de contrôler très précisément le niveau de superhélicité négative de l'ADN.

- La TopoIV

La TopoIV est homologue à la Gyrase. Elle permet, tout comme la Gyrase, le relâchement de la superhélicité positive devant la fourche de réplication. Cependant, leurs contributions respectives ne sont équivalentes. En effet, l'inactivation de la Gyrase et de la TopoIV provoque un arrêt total de la réplication, dû à l'accumulation de supertours positifs devant la fourche de réplication. Alors qu'une inactivation de la Gyrase seule a pour conséquence une diminution du taux de progression de la réplication d'1/3 de sa valeur initiale, suggérant que les supertours positifs peuvent être, en absence de Gyrase, résolus par la TopoIV pour permettre la progression de la fourche de réplication (Khodursky et al., 2000).

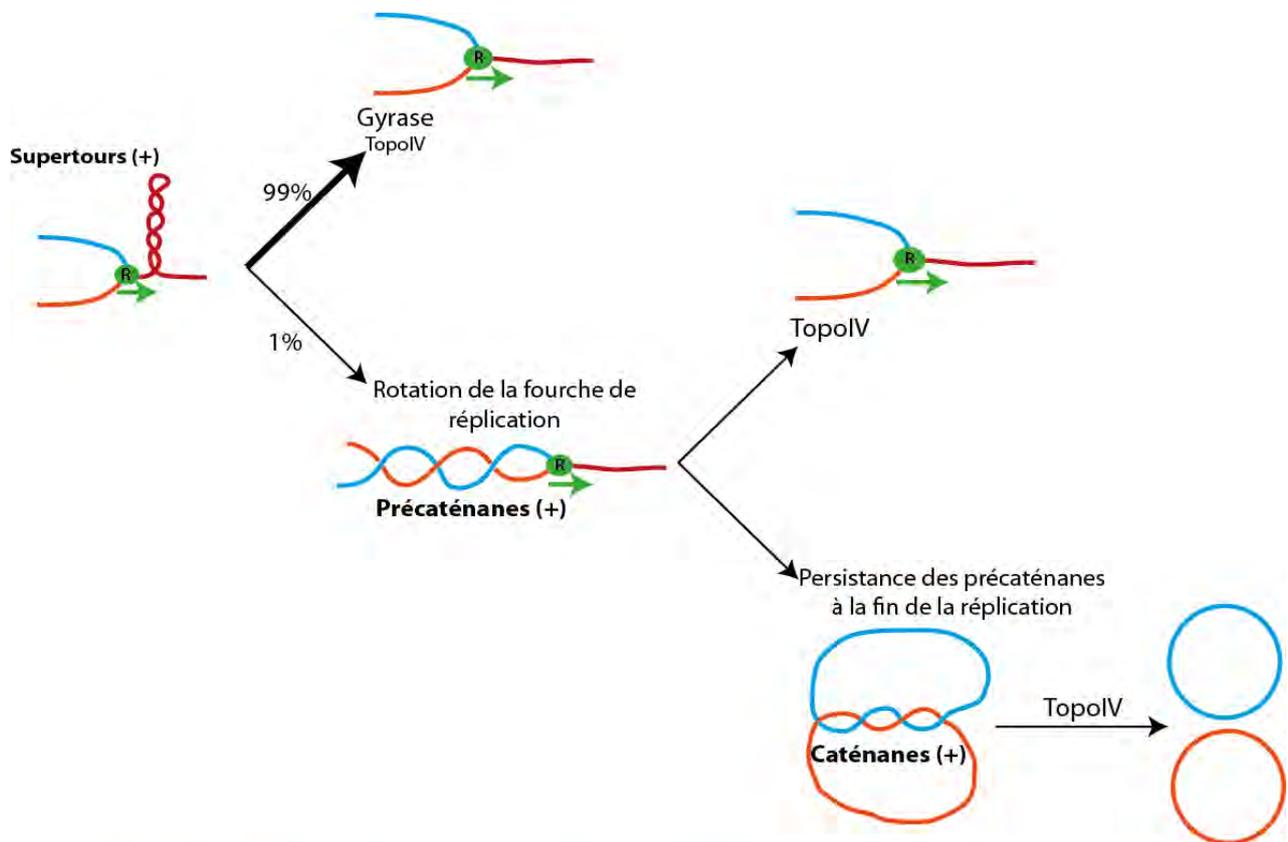


Figure 22 : Résolution des contraintes topologiques induites par la réplication

La progression de la fourche de réplication (la flèche verte indique la direction de la fourche) induit l'accumulation de supertours positifs. Ces supertours positifs sont majoritairement résolus par la Gyrase et la TopoIV. Une partie des supertours positifs passe à travers la fourche de réplication et donne des précáténanes. Ces précáténanes sont soit directement résolus par la TopoIV, soit transformés en caténanes. Les caténanes sont ensuite résolus par la TopoIV pour permettre la ségrégation correcte des deux chromosomes frères. (D'après Reyes-Lamothe *et al.*, 2012)

Cependant, une inactivation de la TopoIV seule n'a que très peu de conséquences sur la progression de la réplication, suggérant qu'en présence de Gyrase, la TopoIV n'intervient que très faiblement dans le relâchement de la superhélicité positive nécessaire à la progression normale des fourches de réplication (Wang et al., 2008).

Le rôle principal de la TopoIV est la résolution des précaténanes et des caténanes. Les précaténanes se forment lorsqu'une partie de la contrainte topologique positive créée par l'avancement de la fourche de réplication, devant celle-ci, bascule à l'arrière, au niveau des deux brins nouvellement répliqués, via la rotation des fourches de réplication. La redistribution des contraintes conduit à un entrelacement des deux brins appelé précaténanes. Lorsque les précaténanes persistent à la fin de la réplication, les deux chromosomes frères se retrouvent entrelacés l'un avec l'autre par ce que l'on appelle les caténanes (Figure 22).

La progression de la machinerie de réplication conduit à la formation de 100 à 200 supertours positifs par Kb. Environ 99% de ces contraintes sont résolues par la Gyrase principalement, et par la TopoIV. Seul 1% des contraintes deviennent des précaténanes (Wang et al., 2008). Les précaténanes sont principalement résolus par la TopoIV, avec une période de cohésion post-réplivative (voir partie 2.5.1) (Nielsen et al., 2006). A la fin de la réplication, certains précaténanes persistent au niveau de la région terminale du chromosome et deviennent des caténanes, qui seront résolus par la TopoIV. En effet, alors qu'une inhibition de la Gyrase n'a pas de conséquences sur l'accumulation des précaténanes, l'inactivation de la TopoIV a pour conséquences une accumulation de précaténanes et un défaut de ségrégation des chromosomes frères (Lesterlin et al., 2012; Wang et al., 2008). De plus, une inactivation de la TopoIV conduit à une réduction de la séparation des loci près d'*oriC* et dans la région terminale du chromosome, suggérant que la TopoIV module la cohésion post-réplivative le long du chromosome via la résolution des précaténanes (voir partie 2.5.1).

- Régulation de la TopoIV

Plusieurs faisceaux d'arguments montrent que l'activité de la TopoIV est finement régulée spatialement et temporellement, par différents facteurs externes : (i) Les précaténanes persistent derrière les fourches de réplication pendant la période de cohésion post-réplivative avant d'être résolus par la TopoIV ce qui indique qu'il y a régulation négative de l'activité de la TopoIV et/ou que d'autres facteurs interviennent dans la cohésion post-réplivative (ii) Le nombre de TopoIV dans la cellule a été estimé à environ 1000 molécules, permettant théoriquement 6000 réactions par seconde, soit bien assez pour résoudre la totalité des précaténanes formés par la réplication (environ 1 précaténanes toutes les secondes) (Postow et al., 2001), mais pourtant certains précaténanes persistent à la fin de la réplication au niveau de la région terminale du chromosome, conduisant à la formation de caténanes. Nous allons voir dans cette partie quels sont les facteurs contrôlant l'activité de la TopoIV. Nous verrons par la suite que l'activité de la TopoIV est régulée par MukB et SeqA (voir la partie 2.5.1), par MatP (voir partie 3.1.3) ainsi que par FtsK (voir la partie 3.2.4).

1.4. Structuration du chromosome d'*E. coli* en MacroDomaines

Le dernier niveau d'organisation que nous allons étudier est l'organisation en MacroDomaines. Il y a quatre MacroDomaines d'environ 1 Mb sur le chromosome d'*E. coli*.

1.4.1. Mise en évidence et caractéristiques des MacroDomaines

La mise en évidence des MacroDomaines est relativement récente, comparée à la mise en évidence des NAPs, de MukB ou encore des domaines topologiques. La localisation en FISH (Fluorescence *In Situ* Hybridization) de 22 séquences, espacées d'environ 230 Kb, a permis de mettre en évidence que le nucléoïde d'*E. coli* est organisé en un anneau compact superposable à la carte génétique du chromosome. Mais surtout, cette même étude a permis de mettre en évidence que les loci situés dans deux larges régions (900 Kb environ) autour d'*oriC* et de *dif* présentaient une même localisation cellulaire et une même dynamique au cours du cycle cellulaire. Suite à cette observation, ces deux régions ont été nommées domaine Ori et domaine Ter (Niki et al., 2000).

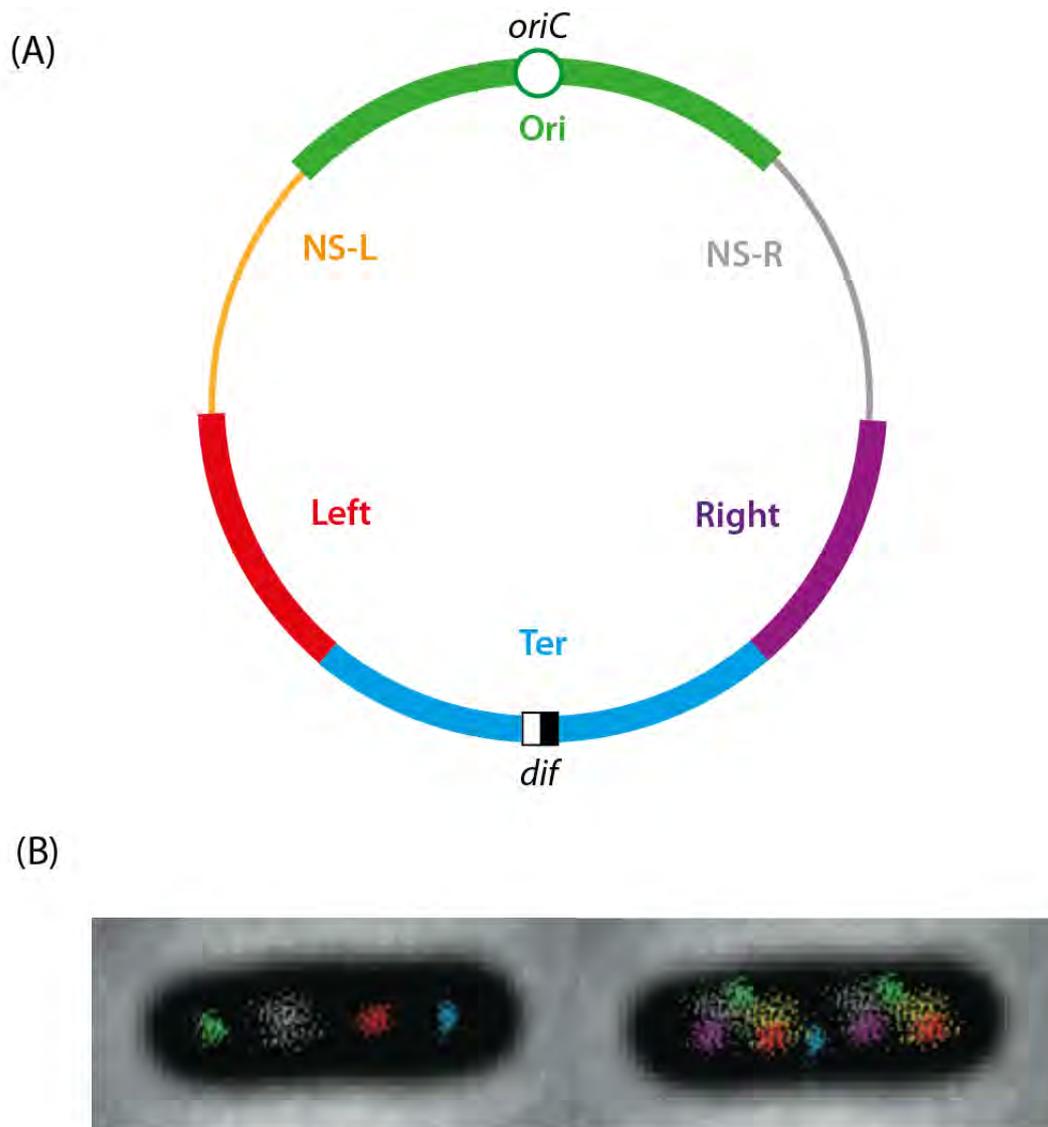


Figure 23 : Organisation du chromosome en MacroDomaines

(A) Le chromosome d'*E. coli* est divisé en 4 MacroDomaines (Ori, Right, Left et Ter) et en 2 régions non structurées (NS-R et NS-L). Les MacroDomaines font environ 1 Kb chacun. (B) La position de plusieurs foci représentatifs de chaque MacroDomaine a été observée en microscopie à fluorescence. Cela permet de mettre en évidence les territoires occupés par chaque MacroDomaine dans une cellule nouvellement née (à gauche) et dans une cellule en fin de réplication (à droite). Les couleurs utilisées sont les même qu'en (A). (D'après Espeli *et al.*, 2008)

Le terme MacroDomaine n'apparaît que quelques années après, suite à l'analyse de l'interaction physique entre loci. Pour explorer l'architecture du chromosome *in vivo*, le groupe de F. Boccard a mis au point un outil, basé sur le système de recombinaison spécifique du phage λ , et permettant d'appréhender la distance spatiale entre deux sites chromosomiques. La recombinaison entre les deux sites *attR* et *attL* se faisant par collision aléatoire, la fréquence de recombinaison est directement proportionnelle à la capacité à entrer en contact des deux sites *att*. Les sites *attR* et *attL* ont été positionnés à différents loci chromosomiques afin de sonder le chromosome. Le premier constat est que la fréquence de recombinaison n'est pas homogène sur le chromosome : deux sites éloignés, mais appartenant à une même région, ont une fréquence de recombinaison plus élevée que deux sites rapprochés, appartenant à deux régions différentes. Ces observations ont permis de définir 4 régions isolées physiquement les unes des autres : les MacroDomaines Ori (correspondant à la région Ori précédemment définie par Niki *et al.*), Ter (correspondant à la région Ter précédemment définie par Niki *et al.*), Right et Left (de part et d'autre du MacroDomaine Ter) (Figure 23).

Deux autres régions moins structurées ont aussi été définies : les régions NS-R et NS-L (pour régions non structurées Right et Left). Au sein de ces régions, la recombinaison entre deux sites *att* est possible. Elle est également possible entre un site *att* localisé dans une région NS et un site *att* localisé dans un MacroDomaine adjacent (Valens *et al.*, 2004).

Cette organisation en MacroDomaines et ces restrictions d'interactions physiques entre les différents MacroDomaines suggèrent l'existence de facteurs permettant la structuration et l'isolement de ces MacroDomaines les uns par rapport aux autres.

1.4.2. Le MacroDomaine Ter

Depuis la mise en évidence de cette structuration en MacroDomaines, diverses approches ont été développées pour définir les mécanismes moléculaires responsables de l'organisation en MacroDomaines. A l'heure actuelle, chez *E. coli*, seul le facteur moléculaire permettant l'organisation du MacroDomaine Ter a été caractérisé. Pour cela, une approche bio-informatique a été utilisée pour identifier des sites surreprésentés dans Ter et sous-représentés sur le reste du chromosome. Cette approche a conduit à l'identification des sites

matS (pour MacroDomain Ter Organisation, voir partie 1.2.1), présents au nombre de 23 dans le MacroDomaine Ter (Mercier et al., 2008).

Un crible génétique a ensuite permis d'identifier la protéine MatP, qui se fixe spécifiquement au niveau des sites *matS* (Mercier et al., 2008). En l'absence de MatP, la compaction et la ségrégation du MacroDomaine Ter sont perturbées, ce qui montre un rôle essentiel de MatP dans l'organisation du MacroDomaine Ter (Dupaigne et al., 2012; Mercier:2008jz ; Espéli et al., 2012). A l'inverse, la compaction et la ségrégation des autres MacroDomaines ne sont pas affectées par l'absence de MatP, ce qui indique que MatP agit de manière spécifique dans l'organisation de ce MacroDomaine en particulier.

Du fait de l'importance de MatP dans la ségrégation du MacroDomaine Ter et de l'importance de la ségrégation de ce MacroDomaine Ter dans le bon déroulement du cycle cellulaire, nous reviendrons plus en détail sur la structure de MatP, ses interactions et son implication dans les différents processus cellulaires dans la troisième partie de ce manuscrit.

2. Le cycle cellulaire d'E. coli

2.1. Généralités sur le cycle cellulaire

Le cycle cellulaire correspond à l'ensemble des étapes constituant et délimitant la vie d'une cellule, notamment les étapes de croissance cellulaire, de réplication du matériel génétique et enfin de division cellulaire. Toutes ces étapes, que ce soit chez les eucaryotes ou les procaryotes, sont hautement contrôlées et concourent à un même but : l'obtention de deux cellules filles identiques à partir d'une cellule mère.

Chez les eucaryotes, les différentes étapes sont strictement indépendantes les unes des autres, dans l'espace et dans le temps. La première étape, l'interphase, est une phase pendant laquelle la cellule grossit, assure les fonctions pour lesquelles elle est programmée et prépare sa division cellulaire. Cette étape est découpée en trois phases : (i) la phase G1 de croissance pendant laquelle la cellule effectue son métabolisme normal, (ii) la phase S pendant laquelle il y a doublement du matériel génétique et (iii) la phase G2 pendant laquelle la cellule assure ses fonctions normales tout en se préparant à se diviser en deux cellules filles. La seconde étape, la mitose, correspond à l'étape de division cellulaire et est divisée en 4 phases distinctes : (i) la prophase pendant laquelle les chromatides sœurs se condensent et forment des paires de chromosomes reliés entre eux au niveau du centromère et aussi pendant laquelle il y a dissolution de l'enveloppe nucléaire, (ii) la métaphase pendant laquelle les chromosomes sont positionnés sur le plan équatorial de la cellule grâce aux microtubules, (iii) l'anaphase pendant laquelle les chromosomes, toujours sous l'action des microtubules, se ségrègent de part et d'autre du plan équatorial et (iv) la télophase pendant laquelle se forment deux enveloppes nucléaires aux extrémités de la cellule, autour des chromosomes homologues. Enfin, une dernière étape de cytokinèse ou cytotélerèse intervient après la mitose, et permet la formation de deux cellules filles individualisées. La cytokinèse est différentes entre les cellules animales (formation d'un sillon perpendiculaire à l'axe du fuseau mitotique et présence d'un anneau contractile assurant le partage du cytoplasme par étranglement) et les cellules végétales (formation d'une nouvelle paroi entre les deux noyaux).

Chez les procaryotes, contrairement aux eucaryotes, les différentes étapes du cycle cellulaire ne sont pas aussi bien individualisées. L'absence de noyau ne permet pas d'isoler spatialement l'étape de réplication du matériel génétique, et supprime l'étape de formation de nouvelles enveloppes nucléaires autour des chromosomes homologues. De plus, chez la majorité des bactéries, l'information génétique est portée par un unique chromosome circulaire, ce qui fait que pendant l'équivalent de la mitose chez les procaryotes, il n'y a qu'un seul chromosome à répliquer et donc deux chromosomes frères homologues à ségréger. Enfin, il est important de noter que la durée moyenne du cycle cellulaire est très différente entre eucaryotes et procaryotes. Pour les bactéries à croissance rapide comme *E. coli*, la durée moyenne du cycle cellulaire est comprise entre 20 et 60 minutes. Concernant *Mycobacterium tuberculosis*, une bactérie à croissance lente, la durée de son cycle cellulaire varie de 24 à 48 heures. Chez les eucaryotes, les durées sont très variables d'une espèce à une autre, d'une lignée cellulaire à une autre, mais aussi entre deux cellules au sein d'une même lignée, mais sont toujours de l'ordre de plusieurs heures. Chez les procaryotes, les différentes étapes du cycle cellulaire doivent donc être réalisées dans un temps beaucoup plus réduit, et c'est pour cela qu'elles ne sont pas temporellement isolées.

2.2. Les paramètres du cycle cellulaire bactérien

Le cycle cellulaire bactérien est caractérisé par quatre paramètres : les périodes B, C, D et le temps de génération (τ). La période C correspond à la période de réplication des chromosomes. La période D correspond à la période de division, qui commence à la fin de la réplication, et prend fin au moment de l'individualisation des deux cellules filles. La période B correspond à la période d'initiation de la réplication, soit la période comprise entre la naissance des cellules filles et le début de la réplication. Enfin le temps de génération (τ) correspond au temps séparant deux divisions cellulaires, soit le temps de doublement (Adachi:2008gn ; Adiciptaningrum et al., 2015).

Chez *E. coli*, ces différents paramètres varient en fonction de la vitesse de croissance. En condition de croissance lente (Figure 24A), ($\tau > 110$ minutes), les différentes périodes sont non chevauchantes, et la somme des trois correspond au temps de génération.

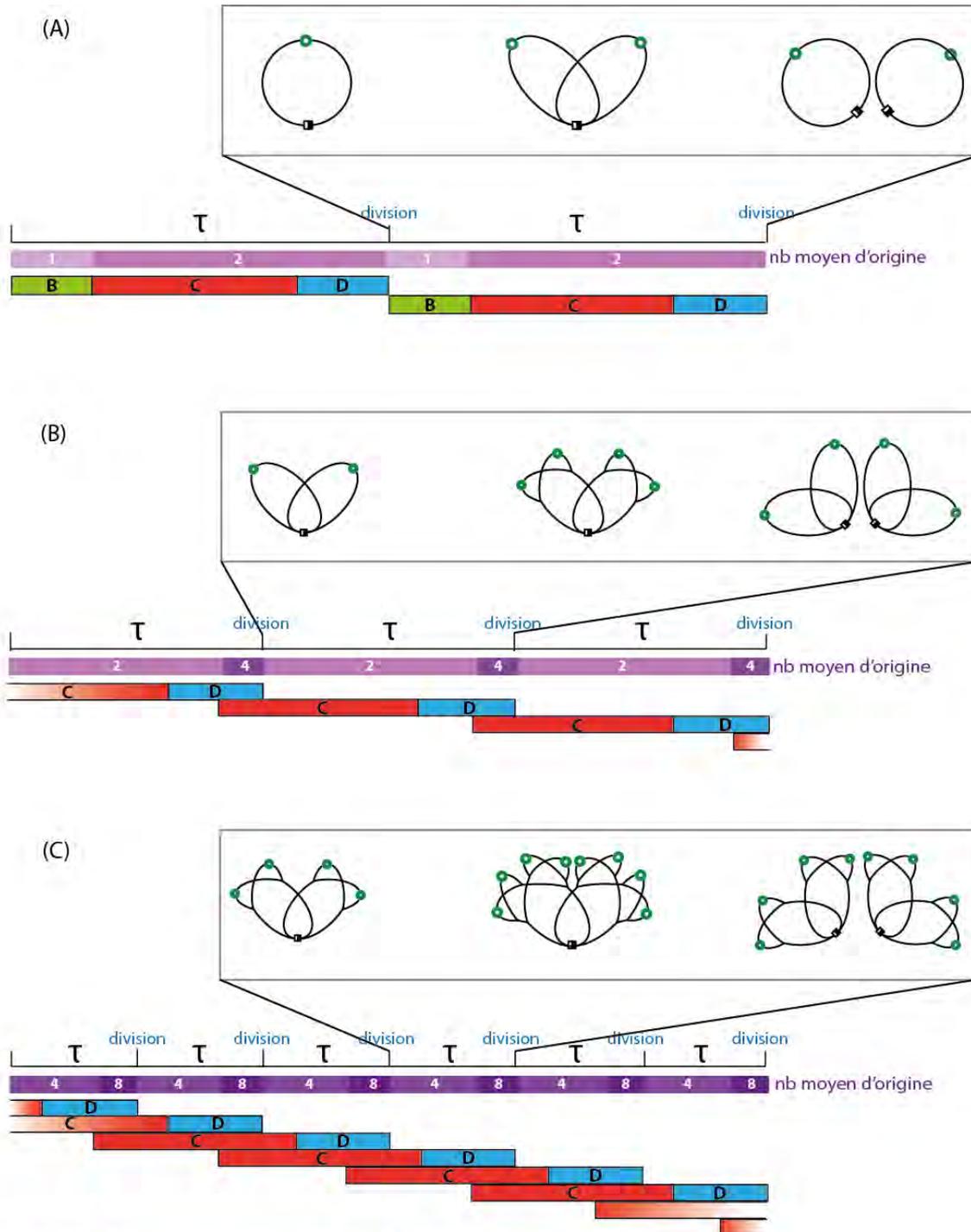


Figure 24 : Les paramètres du cycle cellulaire

(A) En condition de croissance lente, le temps de génération (τ) est supérieur à la somme des période B (réplication) et C (division), les cycles cellulaires sont non chevauchants, et il y a entre une et deux origines de réplication par cellule. (B) En condition plus rapide de croissance, il n'y a plus de période B (initiation), et la période C commence au cours de la génération précédente. On a des cycles chevauchants et deux ou quatre origines par cellule. (C) En condition de croissance encore plus rapide, la période C commence deux générations plus tôt. Il y a entre quatre et huit origines par cellule.

Dans ces conditions, il y a au maximum deux origines de réplication en même temps dans la cellule. Dans ces conditions de croissance, la période B est comparable à la période G1 de croissance chez les eucaryotes, la période C à la phase S de réplication du matériel génétique et la période D à la phase G2 ainsi qu'à la mitose.

Cependant, en condition de croissance plus rapide, il y a un chevauchement des différents cycles. En effet, certaines périodes sont incompressibles, notamment la période C. En condition optimale de réplication, le chromosome de 4,6 Mb est répliqué en 40 minutes (la réplication étant bidirectionnelle et les réplichores étant de taille équivalente, ce temps correspond au temps nécessaire au réplisome pour répliquer 2,3 Mb). De plus, la période D ne peut pas non plus être trop réduite car de nombreux processus post-réplicatifs ont lieu à ce moment-là comme la ségrégation ou la septation. Donc lorsque le temps de génération est inférieur à la somme des périodes C et D ($\tau < C+D$), la réplication est initiée lors de la génération précédente, voire même dans une génération encore plus en amont, et se termine dans la cellule mère, juste avant le début de la période D. Dans ces conditions, on se retrouve avec des cellules ayant au minimum deux origines de réplication par cellule (Figure 24B) et pouvant avoir jusqu'à 8 ou 16 origines de réplication par cellule (Figure 24C).

2.3. L'élongation cellulaire

Au cours d'une génération, il y a une croissance continue de la cellule jusqu'à la division cellulaire. *E. coli* étant un bacille, la croissance se fait uniquement dans la longueur, et non dans la largeur : on parle donc d'élongation. L'élongation conduit, en une génération, au doublement de la longueur de la cellule. *E. coli* appartient aux bactéries dites « à gram négatif » c'est-à-dire que son enveloppe cellulaire est composée d'une membrane externe, d'un espace periplasmique avec une couche de peptidoglycane (PG) et d'une membrane plasmique. L'élongation cellulaire nécessite donc l'élongation du peptidoglycane, qui se fait par intercalation de brins de glycans néo-synthétisés à l'intérieur de la couche de peptidoglycane existante (de Jonge et al., 1989).

La synthèse de peptidoglycane est sous la dépendance d'une famille protéique : les PBPs (pour Penicillins Binding Protein). Parmi les 12 PBPs recensées chez *E. coli*, deux sont directement impliquées dans la synthèse du peptidoglycane : PBP2 pour la synthèse latérale nécessaire à l'élongation cellulaire et PBP3 pour la synthèse septale nécessaire à la division cellulaire. PBP2 est une transpeptidase nécessaire au cross-link du peptidoglycane (Ishino et al., 1986). En son absence, l'élongation est stoppée et les cellules deviennent progressivement sphériques.

D'autres protéines sont elles aussi impliquées dans l'élongation et le maintien de la forme en bâtonnet, notamment RodZ et le complexe MreBCD. Ces protéines sont très conservées. Cependant, leur mode d'action et leurs fonctions restent encore peu claires. On sait que RodZ et MreB sont colocalisées, et forment une spirale dynamique autour de la circonférence de la cellule. De plus, RodZ est essentielle à la rotation spiralée de MreB et fait le lien entre MreB dans le cytoplasme et PBP2 dans l'espace periplasmique, permettant de restreindre la formation de peptidoglycane dans l'espace periplasmique (Morgenstein et al., 2015; van den Ent et al., 2010). L'absence de RodZ entraîne la formation de petites cellules rondes, dû à un raccourcissement de la longueur de la cellule. L'absence de MreB entraîne aussi la formation de cellules rondes de grandes taille, dû cette fois à une augmentation de la largeur de la cellule (Shiomi et al., 2008). MreB est donc impliquée dans la régulation de la taille du petit axe de la cellule alors que RodZ est impliquée dans la régulation de la taille du grand axe de la cellule.

2.4. La réplication du chromosome

La réplication du chromosome est essentielle à l'obtention de deux chromosomes frères identiques et donc au maintien de l'information génétique d'une génération à une autre. La réplication est initiée à l'origine de réplication *oriC*, se propage de manière bidirectionnelle et se termine dans la zone « RFT ». L'initiation de la réplication est finement régulée au cours du cycle cellulaire.

2.4.1. Initiation de la réplication

Afin de ne pas avoir une réinitiation immédiate des deux origines de réplication *oriC* nouvellement répliquées, et donc se retrouver avec un trop grand nombre de cycles répliatifs en parallèle, l'initiation de la réplication est un événement hautement contrôlé au cours du cycle cellulaire. En condition de croissance lente, l'initiation de la réplication est contrôlée afin de n'avoir lieu qu'une seule fois par cycle cellulaire. En condition rapide de croissance, lorsqu'il y a chevauchement des différentes étapes du cycle cellulaire, l'initiation de la réplication a lieu plusieurs fois au cours du cycle cellulaire, et se fait simultanément à toutes les origines de réplication de la cellule. Deux protéines jouent un rôle majeur dans le contrôle de l'initiation de la réplication : la protéine initiatrice DnaA et le facteur de régulation SeqA. L'activité ainsi que la production de la protéine initiatrice DnaA sont régulées par de nombreux facteurs.

- DnaA

L'origine de réplication *oriC* contient des sites de fixation spécifiques pour DnaA appelés DnaA box (voir partie 1.2 .1). La protéine initiatrice DnaA est une ATPase de type AAA+ et elle se fixe avec une haute affinité à la séquence consensus (5'-TTATCCAC-3') des DnaA box. Elle se fixe aussi à un autre type de séquences, appelées « sites I » qui diffèrent légèrement de la séquence consensus des DnaA box et que l'on retrouve entre les différentes DnaA box (Matsui et al., 1985). A proximité des DnaA box et des « sites I », il y a une zone riche en AT composée de trois répétitions de 13-mer appelée région DUE (Figure 2). Cette région contient une troisième classe de séquences de fixation pour DnaA : les ATP-DnaA box. Ces séquences sont similaires aux sites I. DnaA se fixe sur ces séquences uniquement en présence d'ATP (Speck et al., 1999). Pendant la majorité du cycle cellulaire, DnaA reste lié aux trois sites pour lesquels elle a le plus d'affinité : les trois DnaA box. Il y a interaction entre DnaA et les sites pour lesquels l'affinité est plus faible (les sites I et les autres DnaA box) uniquement au début de l'initiation de la réplication, lorsque DnaA est liée à l'ATP (Cassler et al., 1995; Samitt et al., 1989). A ce moment-là, l'oligomérisation de DnaA-ATP au niveau d'*oriC* entraîne la formation d'un complexe nucléoprotéique nécessaire à l'ouverture de la double hélice d'ADN au niveau de zone riche en AT mais aussi au recrutement et au chargement de l'hélicase DnaB, qui permet par la suite le recrutement et l'assemblage de la totalité de la machinerie répliative.

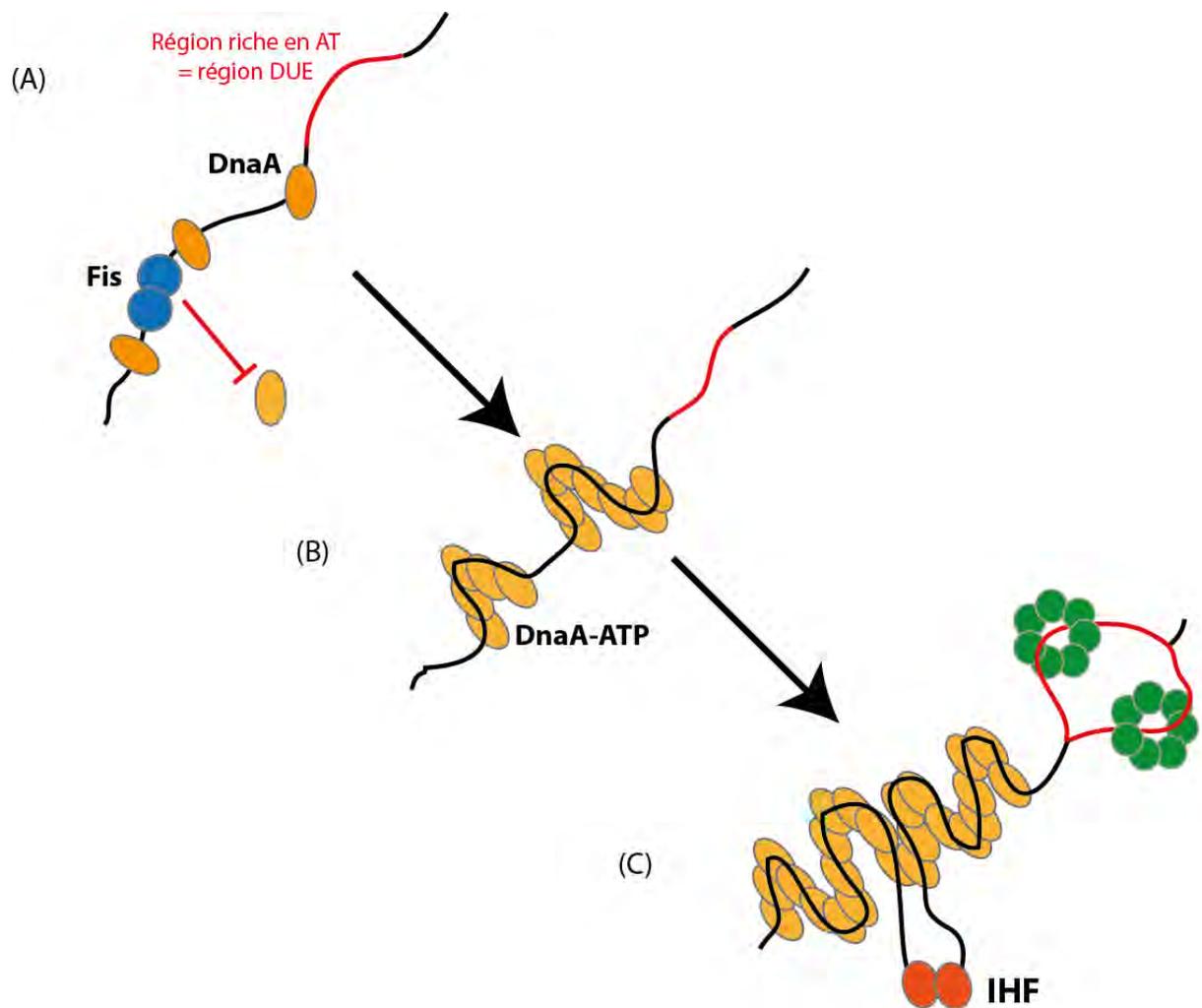


Figure 25 : Rôle de Fis et IHF dans l'initiation de la réplication par DnaA

(A) Avant l'initiation de la réplication, DnaA ne se fixe que sur certains sites à haute affinité. La présence de Fis empêche la fixation de DnaA sur ses autres sites et la fixation d'IHF. (B) Lorsque le niveau de DnaA-ATP augmente dans la cellule, il y a levée de l'inhibition par Fis et donc fixation de DnaA-ATP sur ses sites à haute et faible affinité. (C) La fixation d'IHF sur son site permet le remodelage de l'ADN et de ce fait le remodelage du complexe DnaA-ATP/ADN au niveau d'*oriC*. Cela permet l'ouverture de la double hélice d'ADN au niveau de la région riche en AT et le chargement de l'hélicase à ADN DnaB. (D'après Mott *et al.*, 2007)

- Fis et IHF

L'ouverture de la double hélice d'ADN au niveau de la zone riche en AT nécessite la formation du complexe nucléoprotéique DnaA mais est aussi dépendante de la superhélicité négative et de deux NAPs : Fis et IHF (voir partie 1.3.1). Bien que Fis et IHF ne soient pas essentiels pour la viabilité cellulaire, ils sont nécessaires à la synchronisation de l'initiation de la réplication. Il y a, au niveau d'*oriC*, un site de fixation pour IHF et un site pour Fis (Figure 2).

In vivo, Fis est présent sur son site pendant la majorité du cycle cellulaire, lorsque DnaA est uniquement fixée sur les DnaA box de haute affinité (Figure 25A). A l'initiation de la réplication, il y a diminution de la fixation de Fis, et augmentation de la fixation de IHF et de DnaA-ATP au niveau d'*oriC* (Cassler et al., 1995). La présence de Fis au niveau d'*oriC* empêche la fixation de IHF ainsi que de DnaA sur les sites de plus faible affinité. Lorsque le niveau de DnaA augmente dans la cellule, il y a suppression de l'inhibition par Fis, ce qui permet la fixation à la fois de DnaA et de IHF (Figure 25B) (Ryan et al., 2004). La fixation de IHF au niveau d'*oriC* permet, par l'introduction de courbures, le remodelage de la région. Ce remodelage permet la redistribution de DnaA-ATP des sites de haute affinité vers les sites de plus faible affinité, et participe à l'ouverture de la double hélice d'ADN au niveau de la région DUE (Figure 25C) (Grimwade et al., 2000).

Ces différentes interactions entre DnaA, Fis et IHF permettent une régulation fine de la formation du complexe nucléoprotéique et donc de l'initiation de la réplication. Afin d'éviter qu'il y ait à nouveau initiation de la réplication au niveau des *oriC* nouvellement répliquées, différents mécanismes (notamment la régulation de la quantité de DnaA) et différents partenaires (notamment le facteur de régulation SeqA) entrent en jeu.

- Séquestration des origines par SeqA

oriC contient 11 sites GATC (Figure 2). Les sites GATC ont la particularité d'être méthylés par la DAM méthylase. Les sites sont normalement entièrement méthylés, sauf juste après le passage des fourches de réplication, où les sites sont dans un état transitoire hémiméthylés (Campbell and Kleckner, 1990).

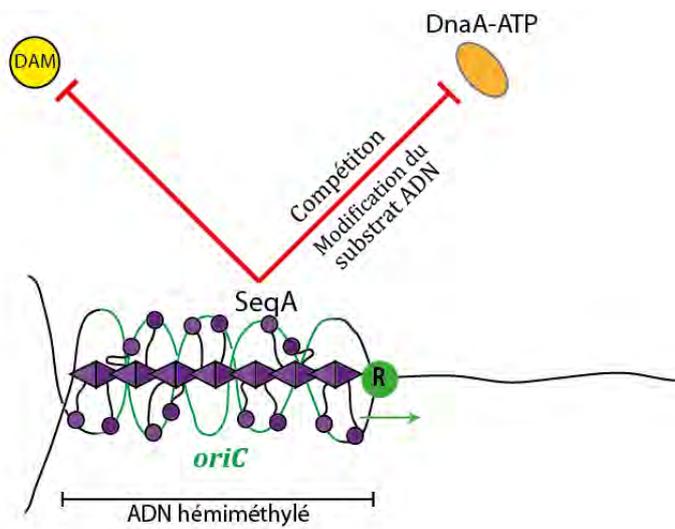


Figure 26 : Séquestration des origines par SeqA

oriC contient 11 sites GATC, qui sont hémiméthylés après la réplication, et le restent pendant 1/3 du cycle cellulaire. SeqA se fixe sur ces sites et inhibe à la fois la méthylation par DAM ainsi que la fixation de DnaA-ATP sur ses sites, par compétition mais aussi par modification de la topologie du substrat ADN.

La protéine SeqA est capable de discriminer les anciennes origines et les origines nouvellement répliquées grâce à l'état de méthylation des sites GATC, en se fixant avec une haute affinité uniquement sur les sites GATC hémiméthylés. SeqA est composé d'un domaine N-terminal permettant l'oligomérisation de la protéine et d'un domaine C-terminal de fixation à l'ADN. La fixation d'un dimère de SeqA sur l'ADN nécessite la présence de deux sites GATC hémiméthylés sur la même face de l'hélice d'ADN pour former une association stable. Il y a ensuite association coopérative sur les autres sites GATC hémiméthylés et formation d'un multimère de SeqA (Figure 26) (Brendler and Austin, 1999). Alors que sur le reste du chromosome, les sites GATC restent hémiméthylés seulement une minute après le passage des fourches de réplication, *oriC* restent hémiméthylés pendant environ 1/3 du cycle cellulaire après le passage des fourches. Pendant ce laps de temps, la formation d'un multimère de SeqA au niveau des *oriC* empêche la méthylation complète des sites GATC, mais aussi la fixation de DnaA sur ces sites de fixation, par compétition (Figure 26) (M. Lu et al., 1994). De plus, la fixation de SeqA provoque une altération de la superhélicité de l'ADN, ce qui inhibe la fixation de DnaA-ATP sur ces sites de faible affinité (Nievera et al., 2006).

La délétion de SeqA abolit le processus de séquestration des origines, induisant des répliquations asynchrones, des initiations de la réplication prématurées mais aussi une localisation anormale des nucléoïdes (Brendler et al., 2000; Freiesleben et al., 1994; M. Lu et al., 1994). SeqA est donc un facteur essentiel dans la régulation de la réplication des chromosomes chez *E. coli*.

En plus de la séquestration des origines par SeqA, la régulation de la transcription, de la localisation et de l'activité de DnaA permet de réguler très finement l'initiation de la réplication.

- [Régulation de la transcription de DnaA](#)

La transcription du gène DnaA est régulée au cours du cycle cellulaire. En effet, le promoteur du gène *dnaA* contient des sites GATC qui restent hémiméthylés aussi longtemps qu'*oriC*. Il va donc y avoir séquestration du promoteur par SeqA. Cette séquestration empêche la machinerie de transcription d'accéder au promoteur (Riber and Løbner-Olesen, 2005).

Comme le gène *dnaA* est situé à proximité d'*oriC*, il y a hémiméthylation du promoteur et donc diminution de la production de DnaA juste après le début de la réplication. De plus, on note la présence de DnaA box au niveau du promoteur du gène *dnaA*. La fixation de DnaA au niveau de son propre promoteur empêche la transcription. Il y a donc aussi une autorégulation négative de la transcription du gène *dnaA* par DnaA (Messer and Weigel, 1997).

- Titration de DnaA

Un nombre considérable de molécules de DnaA peut être titré par d'autres loci chromosomiques qu'*oriC*. Il y a entre 500 et 2000 molécules de DnaA par cellule (le nombre de molécules dépend de la souche étudiée et des conditions de croissance) alors qu'il n'y a qu'entre 10 et 20 molécules de DnaA fixées sur *oriC* (Messer, 2002). Les autres molécules de DnaA se lient à environ 300 sites avec une haute affinité mais aussi à de nombreux autres sites avec une affinité plus faible (Hansen et al., 2007). Parmi ces sites, *datA* est le site de titration majeur de DnaA. Le site *datA* fait environ 1 Kb de long, et contient 5 sites de fixation à haute affinité et 25 sites de fixation à plus faible affinité. Il permet la titration d'environ 60 molécules de DnaA (Hansen et al., 2007).

- Augmentation du pool de DnaA-ATP par les séquences DARS

L'initiation de la réplication nécessite la présence de DnaA-ATP et il est donc possible de contrôler cette initiation en contrôlant le ratio DnaA-ADP/DnaA-ATP. Deux séquences DARS1 et DARS2, situées au milieu des réplichoires gauche et droit, favorisent la conversion de la forme DnaA-ADP en DnaA-ATP. Les séquences DARS contiennent de nombreuses DnaA box. La fixation de DnaA-ATP sur les DARS facilite le relargage de la molécule d'ADP. Les molécules de DnaA sans ADP, ni ATP, et donc inactives, se retrouvent libres dans le cytoplasme, ce qui favorise la fixation d'ATP et la réactivation des molécules de DnaA-ATP (Fujimitsu et al., 2009). L'augmentation du nombre de copie de DARS1 et DARS2 induit des événements d'initiation de la réplication supplémentaires alors que la délétion de ces séquences entraîne un retard d'initiation de la réplication (Fujimitsu et al., 2009), indiquant que ces séquences jouent un rôle majeur dans le contrôle temporel de l'initiation de la réplication.

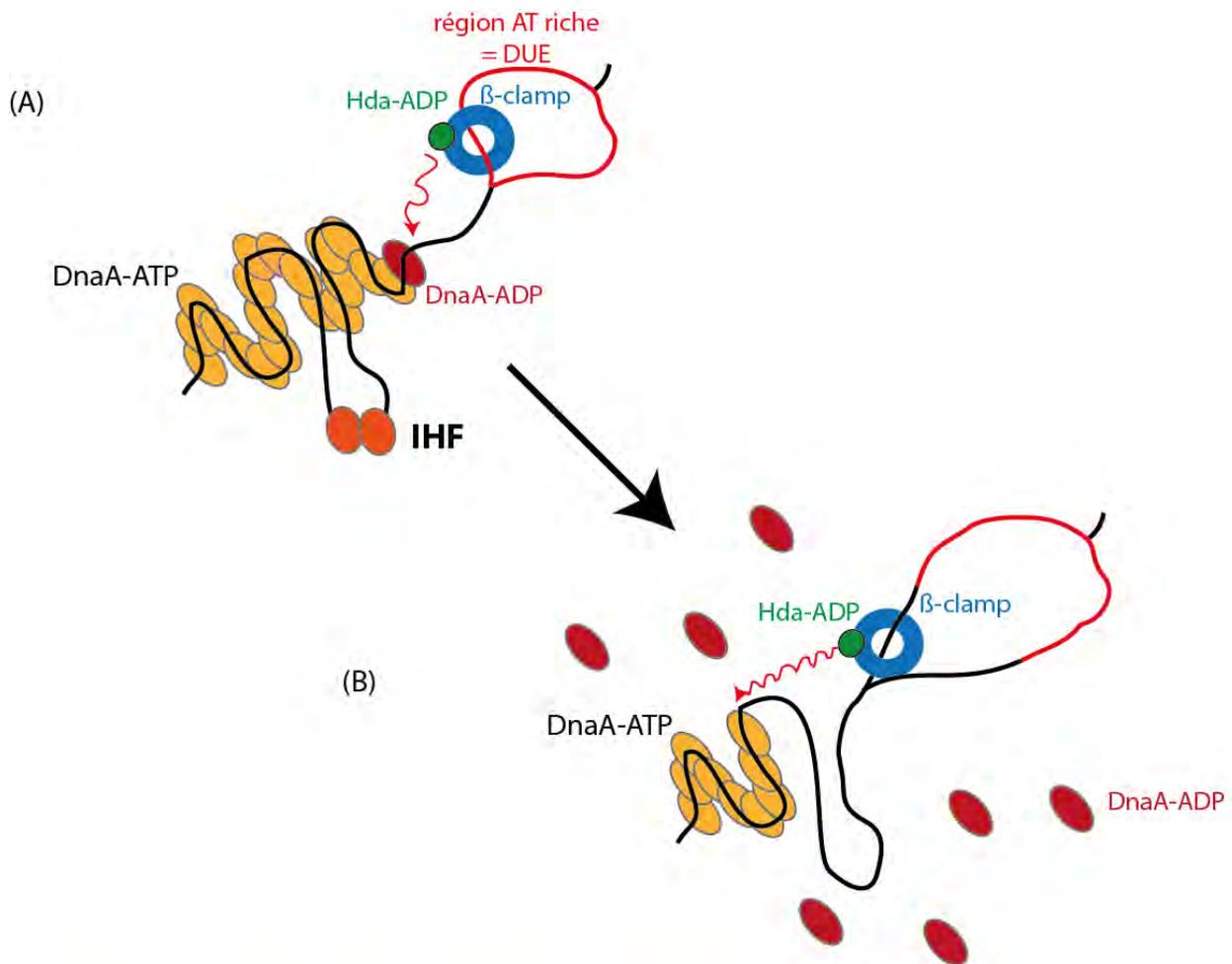


Figure 27 : Système RIDA (Regulatory Inactivation of DnaA)

(A) Après assemblage du réplisome, et début de la réplication, le β -clamp reste sur le brin retardé. Cela permet la formation du complexe β -clamp/Hda-ADP. Hda-ADP interagit avec DnaA-ATP et provoque l'hydrolyse de l'ATP. (B) Les molécules de DnaA-ADP ont moins d'affinité pour leurs sites de liaison. Cela engendre le désassemblage du complexe nucléoprotéique DnaA-ATP/ADN, et donc prévient une réinitiation précoce de la réplication. (D'après Mott *et al.*, 2007)

- Conversion de DnaA-ATP en DnaA-ADP par le système RIDA

Juste après l'initiation de la réplication des origines par DnaA-ATP, il y a hydrolyse de l'ATP par un complexe composé de la protéine Hda-ADP et du β -clamp de l'ADN polymérase III. La forme DnaA-ADP ainsi produite est inactive pour l'initiation de la réplication. Ce système est appelé RIDA pour « *Regulatory Inactivation of DnaA* ». Hda est composé d'un domaine de liaison au β -clamp ainsi que d'un domaine de type AAA+ permettant la liaison à l'ADP et non à l'ATP et contenant un résidu arginine essentiel à l'hydrolyse de l'ATP (Su'etsugu et al., 2008). La formation d'un complexe HdaA-ADP/ β -clamp actif n'est possible qu'une fois qu'il y a eu séparation entre l'ADN polymérase et le β -clamp, et donc à la fin de la synthèse d'un fragment d'Okazaki (voir partie 2.4.2). Le système RIDA permet de « sentir » le début de la réplication du chromosome au niveau d'*oriC* et donc de « sentir » qu'il y a eu initiation correcte de la réplication. A cette condition seulement, le système RIDA permet d'éviter une réinitiation de la réplication précoce. Le système RIDA pourrait marquer la transition entre la phase d'initiation de la réplication et la phase d'élongation de la réplication (Figure 27).

Une analyse en puce à ADN du taux d'initiation de la réplication en condition rapide de croissance a permis de mettre en évidence que le système RIDA est le mécanisme prédominant de prévention de la réinitiation de la réplication. Alors que l'absence de *datA* n'a pas de conséquences visibles sur l'initiation de la réplication et que l'absence de SeqA n'augmente que très peu la réinitiation, l'absence d'Hda augmente la réinitiation d'un facteur deux (Camara et al., 2005).

2.4.2. Elongation de la réplication

L'oligomérisation de DnaA-ATP sur *oriC* ne permet pas uniquement l'ouverture de la double hélice d'ADN mais aussi le recrutement de l'hélicase DnaB. Ce recrutement nécessite l'assistance de la protéine de chargement DnaC et est régulé par la présence d'ATP. Lorsque DnaC a chargé l'hélicase DnaB sur l'ADN, DnaB devient une hélicase répllicative mature capable de dénaturer progressivement l'ADN double brin en matrice simple brin nécessaire à la synthèse des nouveaux brins d'ADN.

L'ADN simple brin ainsi formé est protégé par la protéine SSB (pour Single Binding Protein) afin d'éviter que les deux matrices simples brins reforment de l'ADN double brin avant la synthèse d'ADN.

Compte tenu du sens 5'→3' de la réplication, de la conformation antiparallèle de l'ADN et du mouvement unidirectionnel du réplisome, l'un des brins est synthétisé de façon continue et l'autre de façon discontinue. Le réplisome possède trois ADN polymérases III différentes : une peu processive permettant la synthèse du brin discontinu, une très processive pour la synthèse du brin continu et une de latence (Reyes-Lamothe et al., 2010). Le brin continu est synthétisé sans interruption à partir de l'amorce initiale produite par l'ADN primase DnaG. Concernant le brin discontinu, l'ADN primase synthétise, à intervalle régulier, des amorces ARN. Une fois la synthèse achevée, l'ADN primase est déplacée du brin discontinu et le β -clamp est chargé au niveau de l'extrémité 3' de l'amorce ARN. L'ADN polymérase III s'ancre à l'ADN via le β -clamp et synthétise un nouveau fragment d'ADN appelé fragment d'Okazaki. Lorsque le complexe β -clamp/ADN polymérase III rencontre l'amorce ARN du fragment d'Okazaki précédent, l'ADN polymérase III se décroche du β -clamp et viens se fixer sur un autre β -clamp. L'ancien β -clamp reste à l'extrémité du fragment d'Okazaki. Les amorces ARN sont ensuite remplacées par de l'ADN grâce à la ribonucléase H, qui dégrade l'amorce ARN, et l'ADN polymérase I, qui complète les bases manquantes entre les fragments. Enfin les différents fragments sont reliés les uns aux autres par l'ADN ligase (Pomerantz and O'Donnell, 2007).

2.4.3. Terminaison de la réplication

La réplication prend fin dans la région diamétralement opposée à l'origine de réplication *oriC*, dans une zone de 375 Kb contenant le site *dif*, et bornée par les sites de terminaison de la réplication appelés sites Ter (Figure 2). Les sites Ter, en complexe avec la protéine Tus, permettent de piéger la première fourche de réplication qui arrive dans la région de terminaison de la réplication. Les complexes Ter/Tus bloquent les réplisomes de façon polaire. Leur répartition et leur orientation sur le chromosome sont telles que les réplisomes arrivant dans la région *ter* ne sont pas bloqués alors que ceux en sortant le sont.

La forte affinité de Tus sur Ter est importante pour l'arrêt de la fourche de réplication mais n'explique pas, à elle seule, comment le complexe bloque les fourches de réplication de façon polaire. Différentes hypothèses ont été proposées pour expliquer le blocage des fourches : (i) une interaction physique entre DnaB et la face non permissive du complexe Tus/Ter stoppe la progression des fourches (Bastia et al., 2008), (ii) Tus n'interagit pas de la même façon avec les deux extrémités du site Ter, et l'arrivée de l'hélicase DnaB permet de dissocier le complexe à l'une des extrémités seulement (face permissive) (Neylon et al., 2000) ou (iii) l'arrivée de l'hélicase DnaB en direction de la face non-permissive fait qu'un résidu cytosine (C6) du site Ter se retrouve exposé en dehors de la double hélice d'ADN et interagit spécifiquement avec un domaine de la protéine Tus ; cette interaction pourrait verrouiller le complexe Ter/Tus et donc bloquer la progression de la fourche en orientation non-permissive seulement (notion de « mousetrap ») (Mulcair et al., 2006). Une étude récente montre que l'arrêt des fourches n'est pas dû à une interaction protéine-protéine entre le complexe Ter/Tus et l'hélicase DnaB mais à la fois à la fixation orientée de Tus sur les sites Ter ainsi qu'à l'exposition du résidu cytosine par l'hélicase DnaB et à son interaction avec Tus (Pandey et al., 2015).

Bien que les complexes Ter/Tus aient la capacité d'arrêter les fourches de réplication, un modèle alternatif a été proposé par Hendrickson and Lawrence en 2007 : le modèle de la terminaison de la réplication à *dif*. Ils proposent qu'un site à proximité immédiate de *dif* ou coïncidant avec *dif* fait obstacle à la progression des fourches de réplication et que les sites Ter jouent un rôle uniquement dans l'arrêt des fourches de réplication permettant la réparation des cassures et des mauvais appariements (Hendrickson and Lawrence, 2007). Cependant aucune autre étude ne vient confirmer ce modèle et une étude de S. Bell de 2009 montre que les fourches s'arrêtent bien au niveau des sites Ter (Duggin and Bell, 2009).

Le lieu de terminaison de la réplication reste controversé, mais surtout une grande question subsiste : comment se passe la terminaison de la réplication ? Est-ce qu'il y a désassemblage du complexe après l'arrêt au niveau du complexe Tus/Ter, ou est-ce que le désassemblage n'intervient qu'après rencontre avec la deuxième réplisome encore en mouvement ? Et comment se passe la fusion des deux fourches de réplication afin qu'il y ait réplication complète du chromosome ?

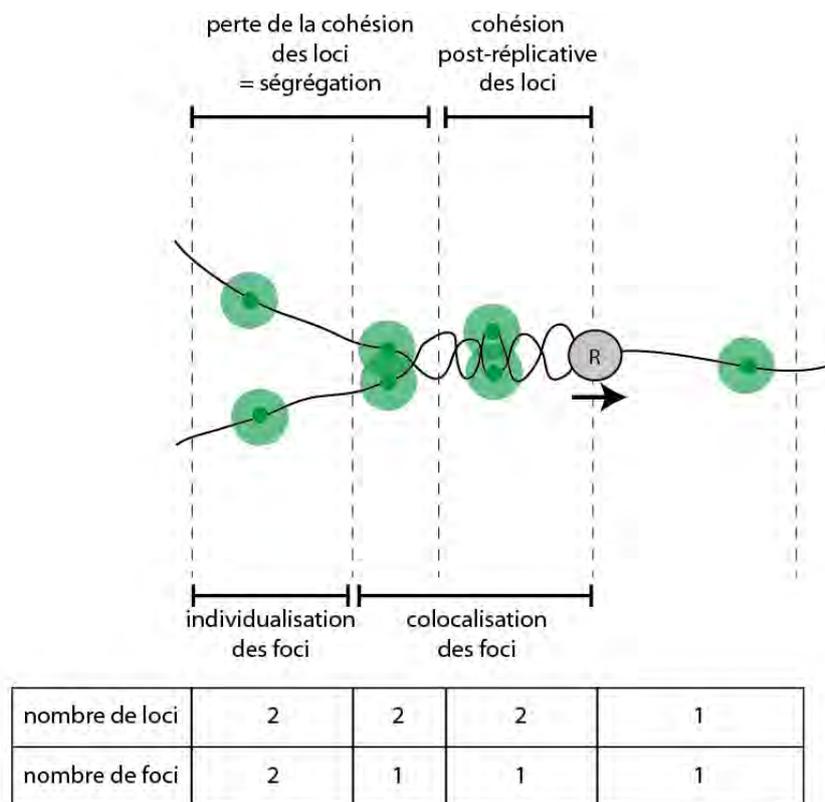


Figure 28 : Différence entre la cohésion des loci et le colocalisation des foci

Après réplication, les loci nouvellement répliqués ne se ségrègent pas immédiatement et restent à proximité l'un de l'autre pendant une période de cohésion post-répliquative. Cette cohésion peut être mesurée par l'utilisation d'outils génétiques mesurant les interactions entre loci. La résolution de la microscopie à fluorescence ne permet pas de calculer la cohésion post-répliquative, mais uniquement la colocalisation des foci.

2.5. Ségrégation des chromosomes

La ségrégation des chromosomes correspond à l'étape de séparation des deux chromatides sœurs nouvellement répliqués. Mais avant de parler de ségrégation à proprement parler, il est important de parler de la cohésion post-réplivative.

2.5.1. Cohésion post-réplivative

La période de cohésion post-réplivative correspond à la période comprise entre la fin de la réplification d'un locus et la ségrégation de ce même locus. Selon cette définition, la ségrégation correspond à la perte de cohésion entre deux loci frères. La notion de cohésion post-réplivative est une notion récente chez les bactéries. Elle a été mise en évidence par l'utilisation d'outils génétiques permettant de mesurer l'interaction entre deux loci frères ainsi que par l'utilisation de la microscopie à fluorescence permettant de visualiser un locus particulier dans la cellule. Cette dernière méthode ne permet pas de calculer réellement la période de cohésion post-réplivative, compte tenu de la résolution de la microscopie à fluorescence trop faible pour différencier deux loci frères colocalisés d'un seul locus, mais plutôt la période de colocalisation entre deux loci frères (Figure 28). Malgré cette limite technologique, la cohésion post-réplivative du chromosome d'*E. coli* a fait l'objet de nombreuses études et l'on connaît différents acteurs de cette cohésion.

La cohésion post-réplivative touche tous les loci du chromosome d'*E. coli*. La perte de la cohésion post-réplivative est progressive, et se fait dans le même ordre que la réplification, de l'origine de réplification *oriC* vers la région terminale du chromosome. La plupart des loci chromosomiques ont une période de cohésion comprise entre 7 et 10 minutes (Nielsen et al., 2006), ce qui signifie qu'il y a, derrière les fourches de réplification, plusieurs centaines de Kb de chromatides sœurs qui restent cohésifs. Cependant, certaines régions du chromosome présentent une cohésion post-réplivative plus longue que le reste du chromosome : c'est le cas de la région autour d'*oriC*, des deux régions dans le domaine Right appelées SNAPs et de la région terminale du chromosome (pour la cohésion post-réplivative de la région *ter*, voir partie 3.1.3.3) (Joshi et al., 2011; Nielsen et al., 2006).

Les deux régions SNAPs sont intéressantes, car en plus de présenter un temps de cohésion post-réplicatif plus long (environ 30 minutes) que les régions situées de part et d'autre, elles sont ségréguées simultanément et leur ségrégation s'accompagne d'une réorganisation globale du chromosome, qui passe d'une morphologie unilobée à une morphologie bilobée (voir partie 2.5.2) (Joshi et al., 2011).

- [Rôle des précatéanes dans la cohésion post-réplivative](#)

Le phénomène de ségrégation qui suit la cohésion post-réplivative est extrêmement rapide, ce qui suggère que le phénomène de cohésion post-réplivative n'est pas un phénomène passif, mais bien un phénomène actif capable de contrebalancer les tensions de ségrégation. Que ce soit pour les loci présentant une période de cohésion post-réplivative normale ou pour les régions présentant une période de cohésion post-réplivative étendue, les précatéanes sont à l'origine de cette cohésion (Lesterlin et al., 2012), et la perte de la cohésion post-réplivative dépend donc de l'activité de la TopoIV, régulée par les protéines SeqA et MukB.

En absence de SeqA, le temps de cohésion post-réplivative est réduit. Par exemple, pour le locus *gln* qui est dans une région SNAP, le temps de cohésion post-réplivative passe de 30 minutes à 12 minutes, soit une réduction du temps de cohésion de 60%. De plus, la diminution du niveau de TopoIV (utilisation d'un mutant thermosensible *parE10*) entraîne une augmentation du temps de cohésion post-réplivative alors que l'augmentation du niveau de TopoIV entraîne une diminution du temps de cohésion post-réplivative (Joshi et al., 2011; Lesterlin et al., 2012; Wang et al., 2008). Le fait que la double mutation *parE10 ΔseqA* ait un phénotype équivalent à la mutation *parE10* et aussi que l'augmentation du niveau de TopoIV, en présence de SeqA, diminue le temps de cohésion indique que la cohésion post-réplivative serait principalement due à la persistance des précatéanes en aval des fourches de réplication. Le rôle de SeqA est donc d'inhiber l'activité de la TopoIV pendant une dizaine de minutes après le passage des fourches pour permettre la persistance des précatéanes.

Cependant, concernant la cohésion des SNAPs ou de la région origine, SeqA semble aussi avoir des fonctions indépendantes de la TopoIV. En effet, le temps de cohésion des SNAPs est réduit de 40% dans un double mutant *parE10 ΔseqA* par rapport à un mutant *parE10* (Joshi et al., 2013). Des études de « *ChIP-on-chip* » ont montré une corrélation entre la cohésion étendue des SNAPs/d'*oriC* et la fixation de SeqA. En effet, les régions SNAPs correspondent à des régions avec une forte densité de sites GATC, et présentent un pic de fixation de SeqA (Joshi et al., 2013).

- [Rôle de MukB dans la régulation de la TopoIV et la cohésion post-répllicative](#)

Des études *in vitro* (Hayama et al., 2013; Hayama and Mariani, 2010) et *in vivo* (Nicolas et al., 2014) ont permis de mettre en évidence une interaction physique et fonctionnelle entre la TopoIV et MukB. Des études d'interaction entre différents mutants de la TopoIV et de MukB (Hayama and Mariani, 2010; Li et al., 2010) ainsi que l'obtention de la structure 3D du complexe MukB/TopoIV (Vos et al., 2013b) montrent que l'interaction se fait entre le domaine « hinge » de MukB (voir partie 1.3.2) et le domaine C-terminal de ParC (sous-unité catalytique ; voir partie 1.2.2.6). Le domaine C-terminal de ParC permet la différenciation entre les substrats superenroulés positivement et négativement grâce à la présence d'une région auto-répressive, au niveau du domaine C-terminal, qui réprime l'activité de relaxation des supertours négatifs de la TopoIV (Vos et al., 2013a). La liaison du « hinge » de MukB au niveau de cette région auto-répressive va masquer celle-ci, permettant la relaxation des supertours négatifs par la TopoIV (Vos et al., 2013b).

Les supertours négatifs ayant la même chiralité que les précatéanes réplcatifs, MukB pourrait, via son interaction avec ParC, stimuler l'activité de décaténation de la TopoIV. Les études *in vitro* n'ont pas permis de démontrer le rôle de MukB dans la stimulation de l'activité de décaténation. Toutefois, on sait que (i) le complexe MukBEF forme un cluster de molécules, que l'on peut visualiser en microscopie à fluorescence, au niveau de l'origine de réplcation et que (ii) la formation de ce cluster de MukBEF est essentiel à la ségrégation correcte des deux origines de réplcation nouvellement répliquées, et à leur positionnement dans la cellule (Danilova et al., 2007).

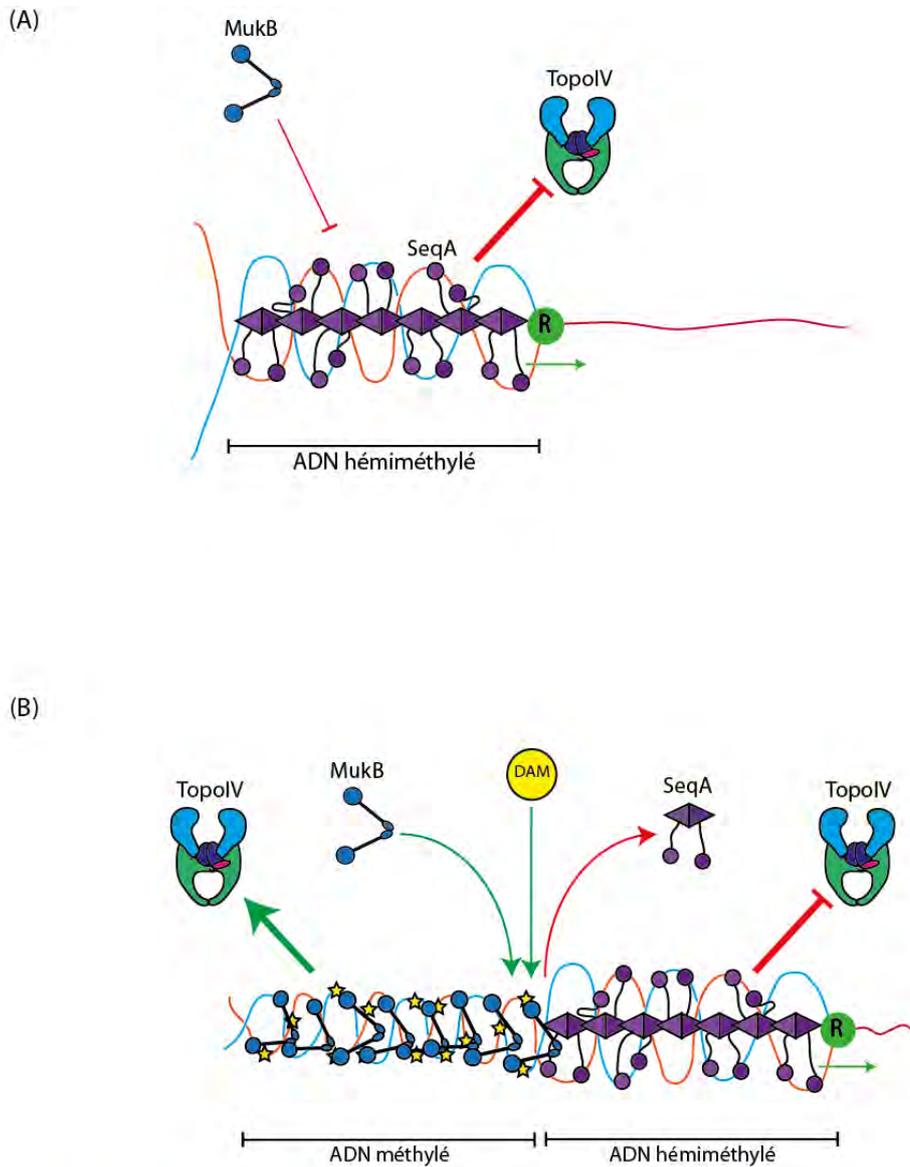


Figure 29 : Régulation de l'activité de la TopoIV à l'arrière des fourches de réplication

(A) SeqA se fixe sur l'ADN hémiméthylé derrière les fourches de réplication et inhibe l'activité de la TopoIV. (B) 5 à 10 minutes après le passage de la fourche, il y a méthylation complète de l'ADN par la DAM méthylase. Cela provoque le relargage de SeqA, et permet la fixation de MukB, qui stimule l'activité de la TopoIV.

Le fait que ParC interagisse directement avec MukB et que, fusionné avec une protéine fluorescente, ParC forme un foci associé avec le cluster de MukBEF au niveau de l'origine de réplication (Nicolas et al., 2014), suggère qu'il existe un lien fonctionnel entre l'activité de décaténation de la TopoIV et la ségrégation correcte des origines de réplication par MukBEF. Il est donc très probable que MukB, en plus de favoriser l'activité de relâchement des supertours négatifs, stimule l'activité de décaténation de la TopoIV.

- [Rôle de SeqA dans la régulation de la TopoIV et la cohésion post-réplivative](#)

Alors que MukB régule positivement la décaténation par la TopoIV, SeqA semble faire l'inverse. SeqA est une protéine composée de deux domaines séparés par un linker : le domaine C-terminal de liaison à l'ADN et le domaine N-terminal de multimérisation. Les dimères de SeqA se fixent sur les sites GATC, avec une faible affinité pour les GATC méthylés, et une forte affinité pour les GATC hémiméthylés (les sites hémiméthylés sont créés à l'arrière de la fourche de réplication). SeqA est surtout connu pour son rôle dans la séquestration des origines de réplication néosynthétisées. En effet, la fixation de SeqA protège les origines de réplication et empêche une réinitiation précoce de la réplication pendant environ 1/3 du cycle cellulaire (M. Lu et al., 1994). Bien que les sites GATC soient présents à une plus forte densité proche de l'origine, il y en a tout le long du chromosome, avec une densité et un espacement variables (l'espacement pouvant aller de 4 pb à 4 Kb). La comparaison entre la densité de sites GATC et le temps de cohésion des chromosomes frères montre une implication de SeqA dans la cohésion post-réplivative (Joshi et al., 2013). En effet, plus il y a de sites GATC, et plus les régions restent cohésives. La levée de la cohésion est due à la méthylation des sites GATC par la méthylase DAM, qui se lie à l'ADN à la recherche de sites hémiméthylés. Cette méthylation intervient en général entre 5 et 10 minutes après le passage des fourches de réplication (Campbell and Kleckner, 1990).

SeqA agit directement sur le temps de cohésion en créant un pontage entre les ADN nouvellement répliqués grâce aux interactions protéines-protéines (Helgesen et al., 2015) et indirectement via la régulation de la TopoIV. En effet, une étude *in vitro* montre qu'une faible concentration (2,5nM) de SeqA stimule la relaxation de l'ADN et la décaténation alors qu'une forte concentration (10nM) inhibe la décaténation par la TopoIV (Kang et al., 2003).

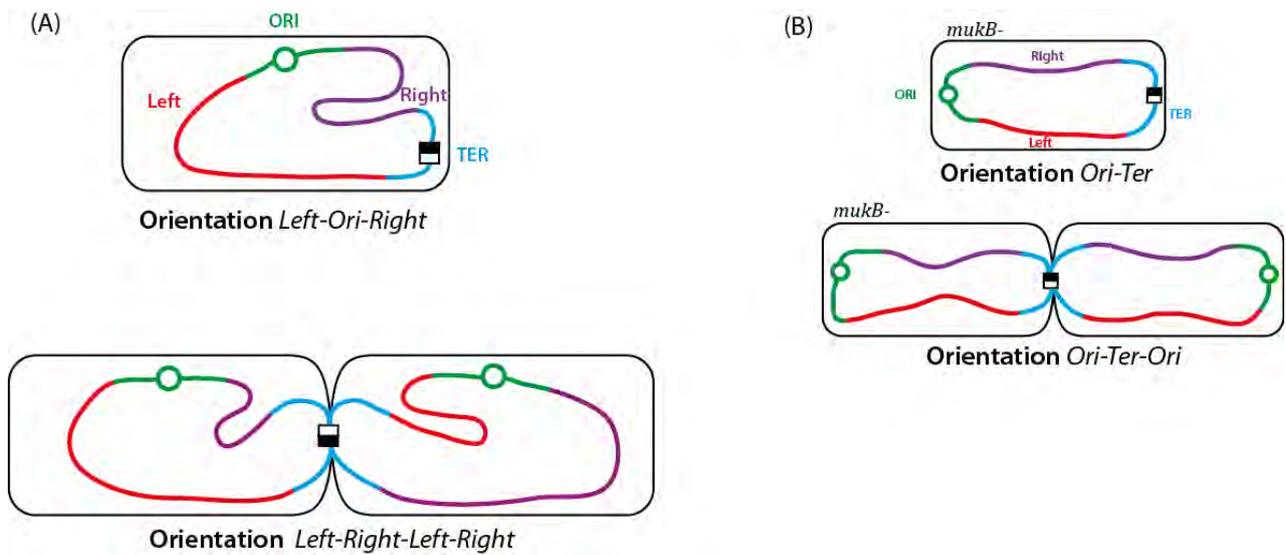


Figure 30 : Orientation *Left-Ori-Right* du chromosome d'*E. coli*

(A) Dans une souche sauvage, le chromosome présente une orientation *Left-Ori-Right* dans une cellule nouvellement née, et une orientation *Left-Right-Left-Right* dans une cellule en cours de réplication. (B) En absence de MukB, l'orientation normale du chromosome est perdue. Dans une cellule nouvellement née, le chromosome est orienté *Ori-Ter* selon l'axe longitudinale. En cours de réplication le chromosome présente une orientation *Ori-Ter-Ori*.

Ces résultats sont corroborés par différentes études *in vivo* montrant (i) qu'une sur-expression de SeqA entraîne une inhibition de la ségrégation (Bach et al., 2003), (ii) qu'une sous-expression de SeqA restaure la viabilité d'une souche *parEts* à température non-permissive (Joshi et al., 2013) et (iii) que la sur-expression de la TopoIV diminue le temps de cohésion de certains loci d'un facteur 3 (Joshi et al., 2013). SeqA, fortement concentré derrière les fourches de réplication, compte tenu de la présence d'ADN néosynthétisé donc hémiméthylé, inhiberait donc la TopoIV qui ne pourrait pas résoudre les précatéanes directement après la réplication, mais seulement après un temps de cohésion post-réplivative correspondant au temps nécessaire à la méthylase DAM pour méthylé l'ADN néosynthétisé.

- [Modèle de régulation de la cohésion post-réplivative par la TopoIV, MukB et SeqA](#)

L'hypothèse la plus simple pour expliquer cette inhibition de la TopoIV par SeqA est que, en se fixant sur l'ADN néosynthétisé, SeqA séquestrerait les précatéanes à l'arrière de la fourche dans une configuration relâchée, ne permettant par la formation de jonction « hooked », substrat préférentiel de la TopoIV (Joshi et al., 2013). Un fois l'ADN néosynthétisé méthylé par DAM, SeqA serait relargué de l'ADN, permettant la fixation de MukB. Cette fixation permettant à la fois le rapprochement des précatéanes et donc la formation de jonction « hooked », substrat préférentiel de la TopoIV, mais aussi l'activation de l'activité de décaténation de la TopoIV (Figure 29).

2.5.2. Chorégraphie du chromosome

Lors du cycle cellulaire, chaque région du chromosome d'*E. coli* va occuper un emplacement précis dans la cellule, et le chromosome va donc avoir une certaine orientation dans la cellule. Plusieurs études proposent une orientation du chromosome de type *Left-Ori-Right* dans la cellule, est une conservation de cette orientation après réplication et ségrégation, donnant une orientation *Left-Right-Left-Right* juste avant la division, et permettant la conservation de l'orientation *Left-Ori-Right* dans les deux cellules filles (Figure 30A).

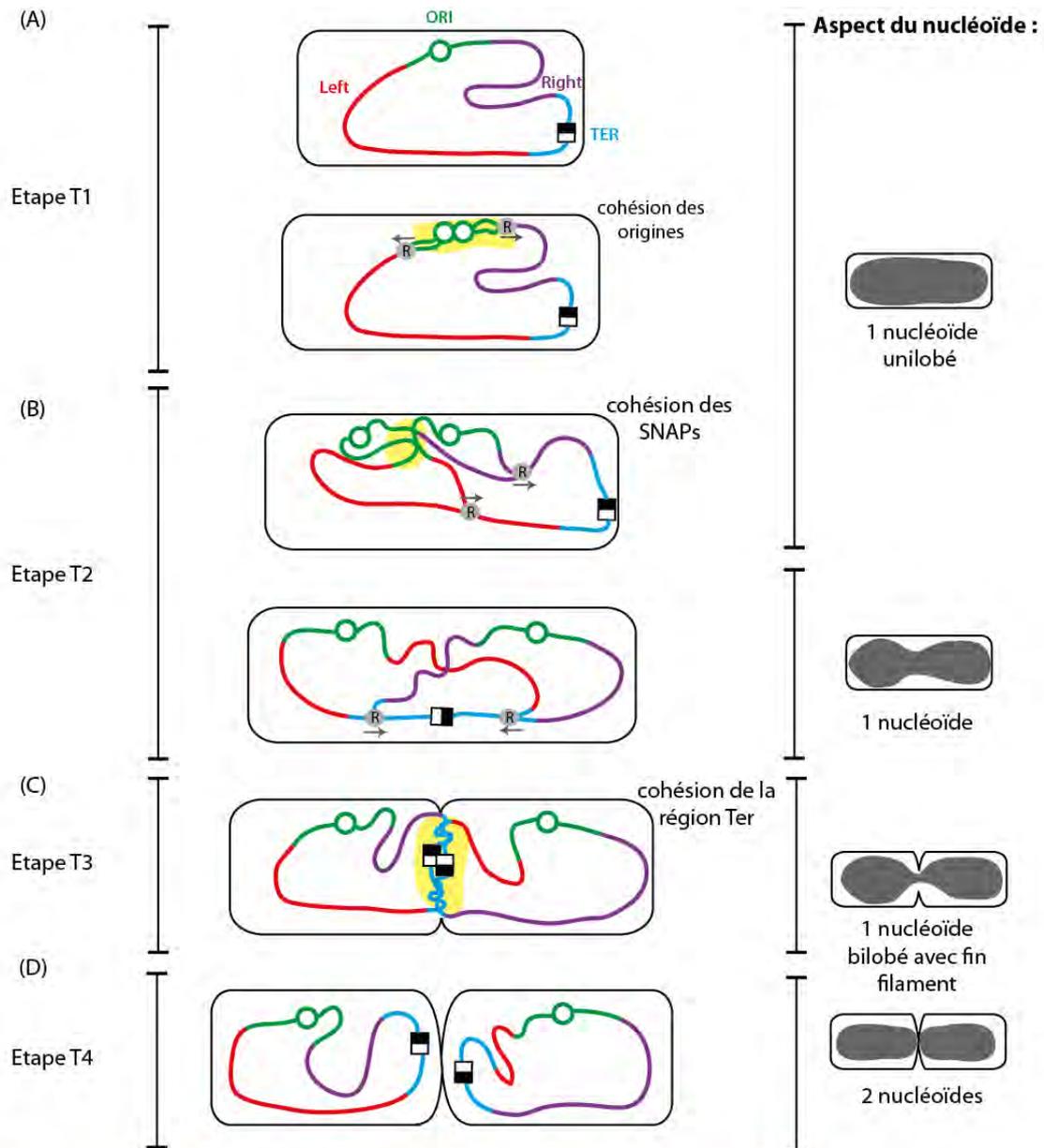


Figure 31 : Chorégraphie du chromosome au cours du cycle cellulaire

La chorégraphie du chromosome est divisée en 4 étapes. (A) L'origine de réplication est répliquée mais non ségrégée. Les deux origines restent cohésives. (B) La réplication progresse. L'une des deux origines est ségrégée à la position 1/4. L'autre reste au centre de la cellule. Le chromosome est ségrégé au fur et à mesure de la réplication, sauf les régions SNAPs qui restent cohésives. Enfin, la ségrégation des SNAPs s'accompagne de la ségrégation de la seconde origine et de la migration de la région Ter au centre de la cellule. Le nucléoïde a un aspect bilobé. (C) La région Ter est répliquée mais non ségrégée. Les deux régions Ter restent au centre de la cellule. Il ne reste qu'un fin filament entre les deux lobes correspondant aux régions Ter cohésives. (D) Les régions Ter sont ségrégées et occupent leur position finale. Il y a fermeture du septum. On observe deux nucléoïdes distincts. (D'après Fisher *et al.*, 2013)

L'analyse en temps réel et en haute définition en trois dimensions du chromosome couplée aux observations plus classiques du positionnement intracellulaire d'un locus donné au cours du cycle cellulaire a permis de définir quatre étapes majeures de la chorégraphie du chromosome (Bates and Kleckner, 2005; Joshi et al., 2013; 2011; Lesterlin et al., 2012; Nielsen et al., 2006; Wang et al., 2006) :

- Etape T1

Avant le début de la réplication, la région origine est au centre de la cellule, la région terminale à un des pôles (le nouveau pôle), et les régions Left et Right sont chacune dans une des moitiés de la cellule. L'origine est ensuite répliquée. Il y a maintien de la cohésion post-répliquative des deux origines (Figure 31A).

- Etape T2

L'une des régions origines migre en direction du vieux pôle, à l'opposé de la région terminale (position 1/4 correspondant au centre de la future cellule fille). L'autre origine reste au centre de la cellule, à sa position initiale. Tous les loci de la région origine ne sont pas ségrégés : les deux régions SNAPs restent cohésives. Il va ensuite y avoir ségrégation des SNAPs. La ségrégation des SNAPs coïncide avec la migration de la seconde origine du centre de la cellule vers la position 3/4 ainsi qu'avec le bilobage du nucléoïde. Juste après la ségrégation des SNAPs, il y a migration de la région terminale du nouveau pôle vers le centre de la cellule (Figure 31B).

- Etape T3

Il y a ségrégation des tous les loci chromosomiques sauf les loci de la région terminale. Cela a pour conséquence une individualisation plus prononcée des deux nucléoïdes. Il ne reste qu'un fin filament entre les deux lobes du nucléoïde, qui correspond à la région terminale en cours de réplication. Toutes les régions du chromosome occupent leur emplacement définitif sauf la région terminale (Figure 31C).

- Etape T4

Il y a ségrégation de la région terminale du chromosome. Les deux régions terminales nouvellement répliquées et ségréguées restent au centre de la cellule, zone qui va correspondre aux deux nouveaux pôles des deux cellules filles après fermeture complète du septum de division (31D).

2.5.3. Mécanismes actifs de ségrégation des chromosomes

La cohésion post-réplivative est un acteur essentiel à la ségrégation des chromosomes. Comme attendu, une augmentation de la cohésion par diminution du niveau de TopoIV dans la cellule a pour conséquence une absence de ségrégation et éventuellement un arrêt du cycle cellulaire. Et contrairement à ce que l'on pourrait penser, une diminution de la cohésion a aussi pour conséquence une diminution de la vitesse de séparation des deux chromosomes et un bilobage incomplet du nucléoïde (Joshi et al., 2013). Cependant, compte tenu de la vitesse et de la précision de la ségrégation à la fin de la cohésion post-réplivative, la ségrégation ne peut pas être due uniquement au relâchement de la cohésion post-réplivative par la TopoIV.

2.5.3.1. Ségrégation de la région origine

Chez de nombreuses espèces bactériennes, l'organisation et la localisation de la région origine est sous le contrôle du système Par. Le système Par est un système à trois composants : un site centromérique (*parS*), une protéine de liaison au site *parS* (ParB) et une protéine de type ATPase (ParA). Les systèmes Par ont différentes implications, en fonction de la bactérie et du type de réplicon. Chez les bactéries avec un unique chromosome, ils sont souvent non essentiels à la ségrégation, sauf au moment de l'entrée en phase stationnaire ou en sporulation. Chez les bactéries multi chromosomiques, ils sont essentiels à la ségrégation correcte des différents réplicons.

D'autres bactéries, notamment *E. coli*, ne semblent pas posséder de système de partition de type Par. Cependant, la ségrégation des origines est suffisamment rapide et précise pour être active. La condensation des origines par les protéines de types NAPs peut expliquer leur séparation, mais pas leur ségrégation rapide aux positions 1/4 et 3/4.

- Rôle de *migS*

Chez *E. coli*, une séquence *migS* de 25 pb a été identifiée comme potentiellement importante pour la ségrégation de la région origine, du fait de sa dynamique de ségrégation particulière. *migS*, localisée à 211 Kb d'*oriC* et donc répliquée après *oriC*, est la première séquence à être ségrégée vers les positions 1/4 et 3/4 avant *oriC*. *migS* semble être impliquée dans le positionnement correct d'*oriC* aux positions 1/4 et 3/4. En effet, une première étude montre que la délétion de *migS* entraîne un mauvais positionnement d'*oriC* après réplication (Yamaichi and Niki, 2004). Cependant, ces résultats n'ont pas été confirmés par la suite (Fekete and Chatteraj, 2005). De plus, la délétion de *migS* n'a pas de conséquences sur la ségrégation de l'ensemble du chromosome. *migS* ne semble donc pas être une séquence de type centromère, impliquée dans la ségrégation de l'origine de réplication via un système Par.

- Rôle de MukB

MukB, comme la majorité des protéines de types SMC eucaryotes et procaryotes, joue un rôle essentiel dans la ségrégation des chromosomes (Nolivos and Sherratt, 2014). MukB forme des foci qui colocalisent avec les régions origines et est essentiel au positionnement correct des régions origines, mais aussi au positionnement correct du reste du chromosome, que ce soit pendant la réplication, ou à n'importe quel autre moment du cycle cellulaire (Badrinarayanan et al., 2012a; Danilova et al., 2007). Alors qu'en condition sauvage le chromosome a une orientation *Left-Ori-Right* (voir partie 2.5.2), l'absence de MukB a pour conséquence une réorientation du chromosome selon l'axe longitudinal avec la région origine à l'ancien pôle, la région terminale au nouveau pôle et les régions Right et Left entre les deux, et non plus réparties dans chaque moitié de la cellule (Figure 30B) (Badrinarayanan et al., 2012a; Danilova et al., 2007).

De nombreuses études ont montré, *in vivo* et *in vitro*, une interaction entre MukB et la TopoIV au niveau de l'origine de réplication (Hayama and Mariani, 2010; Li et al., 2010; Nicolas et al., 2014; Vos et al., 2013b; Zawadzki et al., 2015). L'interaction MukB/TopoIV permet une localisation préférentielle de la TopoIV au niveau de la région origine, et permet de potentialiser son activité de décaténation, essentielle au relâchement de la cohésion post-répllicative, et donc à la ségrégation de cette région.

L'analyse du positionnement de MukB en absence de TopoIV et du positionnement de la TopoIV en absence de MukB indique que c'est bien le positionnement de MukB au niveau de l'origine de réplication qui permet ensuite le recrutement de la TopoIV dans cette région. La question qui reste en suspens à l'heure actuelle est de savoir comment MukB se localise préférentiellement au niveau d'*oriC*, et localise les *oriC* aux positions 1/4 et 3/4. Une étude parue en 2016 montre que la protéine MatP, impliquée dans l'organisation de la région terminale du chromosome, est impliquée dans le positionnement de MukB (voir partie 3.1.3.3).

2.5.3.2. Ségrégation du reste du chromosome

Une fois les régions origines correctement ségréguées aux positions 1/4 et 3/4, la ségrégation des réplichoes *Left* et *Right* semble être due à la compaction de l'ADN le long de des réplichoes ; cette compaction se faisant grâce à la fois à MukB, aux protéines de type NAPs et aux surenroulements de l'ADN. Cette hypothèse est soutenue par le fait que (i) la ségrégation des loci nouvellement répliqués se fait de façon séquentielle, (ii) les loci nouvellement répliqués vont ensuite colocaliser avec les loci situés juste avant sur la carte du chromosome et (iii) les souches délétées des protéines NAPs ou de MukB présentent généralement des défauts de ségrégation (Britton et al., 1998; Graumann, 2001; Helgesen et al., 2016; Niki et al., 1991). De plus, la délétion de MukB provoque un changement d'orientation du chromosome (voir partie 2.5.3.1) (Danilova et al., 2007). MukB est donc impliqué dans l'organisation et la localisation des origines de réplication et c'est cette localisation et cette organisation des origines par MukB qui serviraient de point de départ pour la condensation des deux réplichoes, de part et d'autres de l'origine, et donc dicteraient la ségrégation des deux réplichoes après réplication.

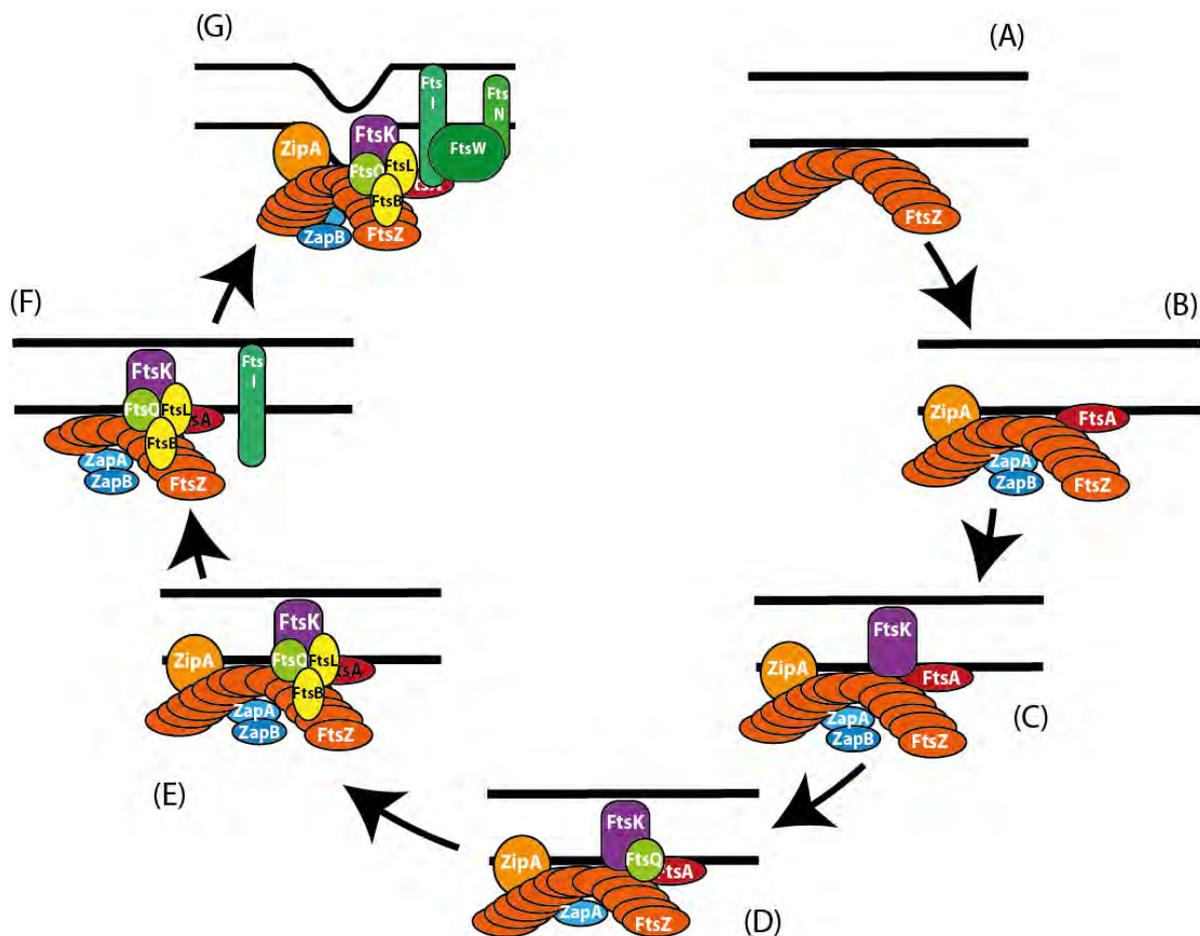


Figure 32 : Recrutement séquentiel des différentes protéines du divisome

FtsZ forme un anneau au centre de la cellule (A). L'anneau Z est ancré à la membrane via ZipA et FtsA et stabilisé grâce aux protéines ZapA, ZapB, ZapC et ZapD (B). Il y a ensuite recrutement de FtsK (C), puis du complexe FtsQLB (D et E). FtsI (PBP3) est ensuite recrutée (F). Enfin FtsW est recrutée et semble participer à l'adressage à la membrane de FtsN, la dernière protéine du divisome (G).

2.6. La division cellulaire

La réplication du chromosome et la ségrégation correcte des deux copies dans les deux futures cellules filles sont une étape essentielle pour la conservation de l'information génétique d'une génération à une autre. L'autre étape essentielle qui intervient après cela est évidemment la division cellulaire, qui permet l'obtention de deux cellules filles à partir d'une seule cellule mère. Chez *E. coli*, la division cellulaire se fait par scissiparité, au centre de la cellule, et nécessite le recrutement d'un complexe protéique majeur appelé divisome. Le divisome comprend des protéines impliquées dans la constriction du septum mais aussi des protéines de synthèse du peptidoglycane septal.

2.6.1. L'anneau Z

- Structure et polymérisation de FtsZ

La première étape de la division est la mise en place, au centre de la cellule, d'un anneau de FtsZ appelé anneau Z. FtsZ est une protéine essentielle, très conservée et ubiquitaire, que l'on retrouve dans la majorité des espèces bactériennes. Elle est nécessaire au recrutement de toutes les autres protéines du divisome (Figure 32).

FtsZ présente peu d'identité de séquence avec les tubulines eucaryotes, mais l'obtention de sa structure tridimensionnelle a permis de mettre en évidence des similarités de structure entre la tubuline eucaryote et FtsZ (Löwe and Amos, 1998). FtsZ possède deux domaines globulaires séparés par une hélice centrale. Le domaine N-terminal contient les résidus nécessaires à la fixation et à l'hydrolyse du GTP. Le domaine C-terminal est impliqué dans les interactions latérales entre les différents protofilaments ainsi que les interactions avec les autres protéines du divisome. FtsZ forme des filaments grâce à une interaction entre l'extrémité chargée positivement d'un monomère et l'extrémité chargée négativement du monomère suivant. Cette association est nécessaire à la formation d'un site actif complet permettant la fixation et l'hydrolyse du GTP (Scheffers et al., 2002).

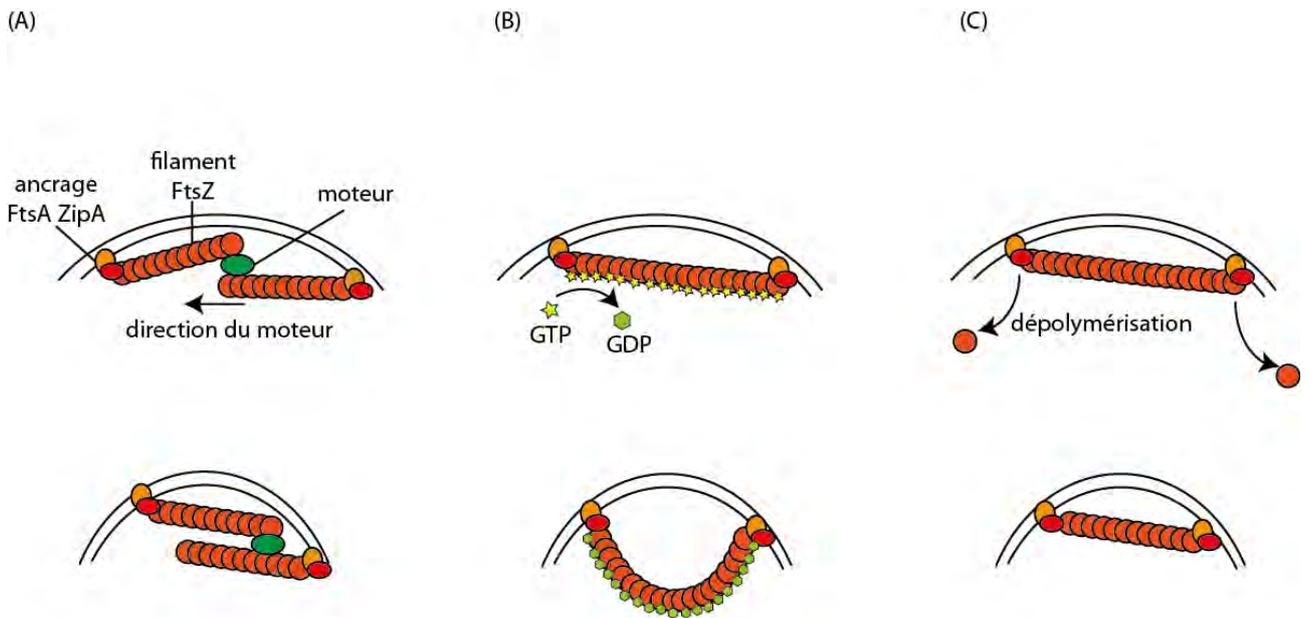


Figure 33 : Modèles de constriction du septum

La diminution du diamètre de l'anneau Z est dépendante (A) d'un moteur protéique qui permet le glissement des protofilaments de FtsZ les uns sur les autres, (B) de la courbure des protofilaments après hydrolyse de GTP en GDP ou (C) de la dépolymérisation des protofilaments au niveau de leurs sites d'attachement à la membrane. (D'après Bramhill *et al.*, 1997)

Les filaments s'assemblent ensuite sous forme de protofilaments grâce à des interactions latérales entre les molécules de FtsZ (Yu and Margolin, 1997). L'activité d'hydrolyse du GTP est dépendante de la fixation de GTP et de Mg²⁺, et est stimulée par la présence de K⁺ (Mendieta et al., 2009). Sous ces conditions, la dynamique de polymérisation-dépolymérisation *in vitro* est extrêmement rapide ; l'incorporation et la désincorporation continues de monomères permet un renouvellement du polymère en 10 secondes environ (Anderson et al., 2004). *In vivo*, la durée de demi-vie de l'anneau de FtsZ a été estimé à environ 30 secondes (Stricker et al., 2002). L'anneau Z est donc une structure très dynamique, dans laquelle les filaments de FtsZ sont perpétuellement en cours de polymérisation/dépolymérisation.

Les quinze derniers résidus du domaines C-terminale forment un « *hub* » central impliqué à la fois dans la stabilité de FtsZ, sa polymérisation et son ancrage à la membrane. En effet, ce « *hub* » permet l'interaction entre FtsZ et au moins 6 de ses partenaires : FtsA et ZipA qui permettent l'ancrage à la membrane, MinC et SlmA qui inhibent la polymérisation de FtsZ, ZapD qui stabilise FtsZ et ClpX qui est impliquée dans la dégradation de FtsZ.

- [Hypothèse sur la constriction du septum](#)

Les mécanismes permettant la constriction du septum ne sont pas encore connus. La seule certitude est que la constriction du septum nécessite un ancrage de l'anneau Z à la membrane. Différents modèles pour expliquer le phénomène de constriction sont proposés :

- De petits filaments de FtsZ pourraient glisser les uns sur les autres grâce à l'action d'un moteur protéique. Cela pourrait engendrer une diminution du diamètre de l'anneau Z, et donc une diminution du diamètre cellulaire (Bramhill, 1997) (Figure 33A).
- Les protofilaments de FtsZ formés en présence de GTP sont droits alors que ceux formés en présence de GDP sont courbés. L'hydrolyse de GTP en GDP pourrait être à l'origine de la courbure des filaments et donc de la constriction (C. Lu et al., 2000) (Figure 33B).

- Les protofilaments de FtsZ seraient progressivement dépolymérisés au niveau de leurs sites d'attachement à la membrane (Rivas et al., 2000) (Figure 33C).

Ces trois modèles ne sont pas mutuellement exclusifs, et on peut facilement imaginer que l'invagination de la membrane soit dû à la fois au glissement des protofilaments les uns sur les autres, à la courbure des filaments de FtsZ-GDP et à la dépolymérisation au niveau des ancrages à la membrane.

2.6.2. Contrôle de la mise en place de l'anneau Z

La mise en place du divisome, et notamment la formation de l'anneau Z, est régulée spatio-temporellement de manière très précise. Cette régulation est nécessaire à la formation de deux cellules filles identiques, possédant chacune une copie intacte du matériel génétique. En effet, si l'anneau Z ne se forme pas au centre de la cellule mais dans une zone où il y a de l'ADN, ou encore si l'anneau Z se forme trop tôt, alors que les chromosomes ne sont pas ségrégués, il y a un risque de guillotinage de l'ADN. Et ce guillotinage peut entraîner des cassures de l'ADN, des retards de division, des formations de cellules sans ADN... Deux acteurs majeurs contrôlent la mise en place du septum de division chez *E. coli* : le système MinCDE et la protéine d'occlusion par le nucléoïde SlmA.

2.6.2.1. Le système MinCDE

La mutation du système Min est associée à un phénotype particulier : la formation de mini-cellules (d'où Min pour Mini-cellule). Ce phénotype résulte du placement de l'anneau Z et donc du septum près d'un des pôles de la cellule, conduisant à la formation d'une mini-cellule sans chromosome, et d'une cellule plus longue, possédant les deux copies du chromosome (Adler et al., 1967). Le locus associé à ce phénotype consiste en trois gènes (*minC*, *minD* et *minE*) organisés en opéron (de Boer et al., 1988). Les trois protéines qui composent le système Min oscillent d'un pôle à l'autre de la cellule, et c'est cette oscillation qui contrôle le positionnement de l'anneau Z dans la cellule.

MinC est la protéine effectrice du système Min. Son domaine N-terminal empêche la polymérisation de FtsZ en affaiblissant les interactions longitudinales au sein des filaments de FtsZ (Hu and Lutkenhaus, 2000; Shen and Lutkenhaus, 2010). Son domaine C-terminale régule les interactions latérales entre les protofilaments (Dajkovic et al., 2008). Ces deux domaines travaillent en synergie pour inhiber la formation de l'anneau Z. Le domaine C-terminal joue aussi un rôle dans la dimérisation de MinC, ainsi que dans son interaction avec MinD (Hu and Lutkenhaus, 2000; Johnson et al., 2002).

MinD appartient à la famille des ATPase WACA (Walker A Cytoskeletal ATPase). La fixation d'ATP provoque un changement de conformation de MinD. Ce changement de conformation est essentielle à la dimérisation de MinD et à son association avec la membrane (Zhou and Lutkenhaus, 2003). Seule la forme dimérique est active et peut interagir avec MinC, et localiser MinC à la membrane (Lackner et al., 2003).

Le troisième partenaire du système Min est la protéine MinE. MinE contient trois domaines fonctionnels distincts : une région N-terminale possédant un motif de liaison à la membrane, un domaine anti-Min et un domaine de dimérisation (Hsieh et al., 2010). Le domaine anti-Min possède des résidus capables d'interagir avec MinD et de stimuler son activité ATPasique. L'hydrolyse de l'ATP provoque la dissociation du dimère de MinD, et de ce fait la dissociation du complexe MinC-MinD (Hu and Lutkenhaus, 2000).

L'utilisation de protéines de fusions a permis la visualisation de l'oscillation des trois protéines du système Min dans la cellule. MinC et MinD sont localisées à la périphérie d'une des moitiés de la cellule et oscillent d'un pôle à l'autre de la cellule, créant une zone dite polaire (Raskin and de Boer, 1999) (Figure 34A). MinE forme une structure de type anneau (appelée anneau E) qui oscille du centre de la cellule vers un des pôles, puis du centre de la cellule vers l'autre pôle, et ainsi de suite (Figure 34B) (Hsieh et al., 2010). L'oscillation de MinD est dépendante de MinE, et inversement. Par contre, MinC n'a aucune influence sur l'oscillation de ces deux protéines, et est recrutée passivement au niveau de la zone polaire grâce à son interaction avec MinD.

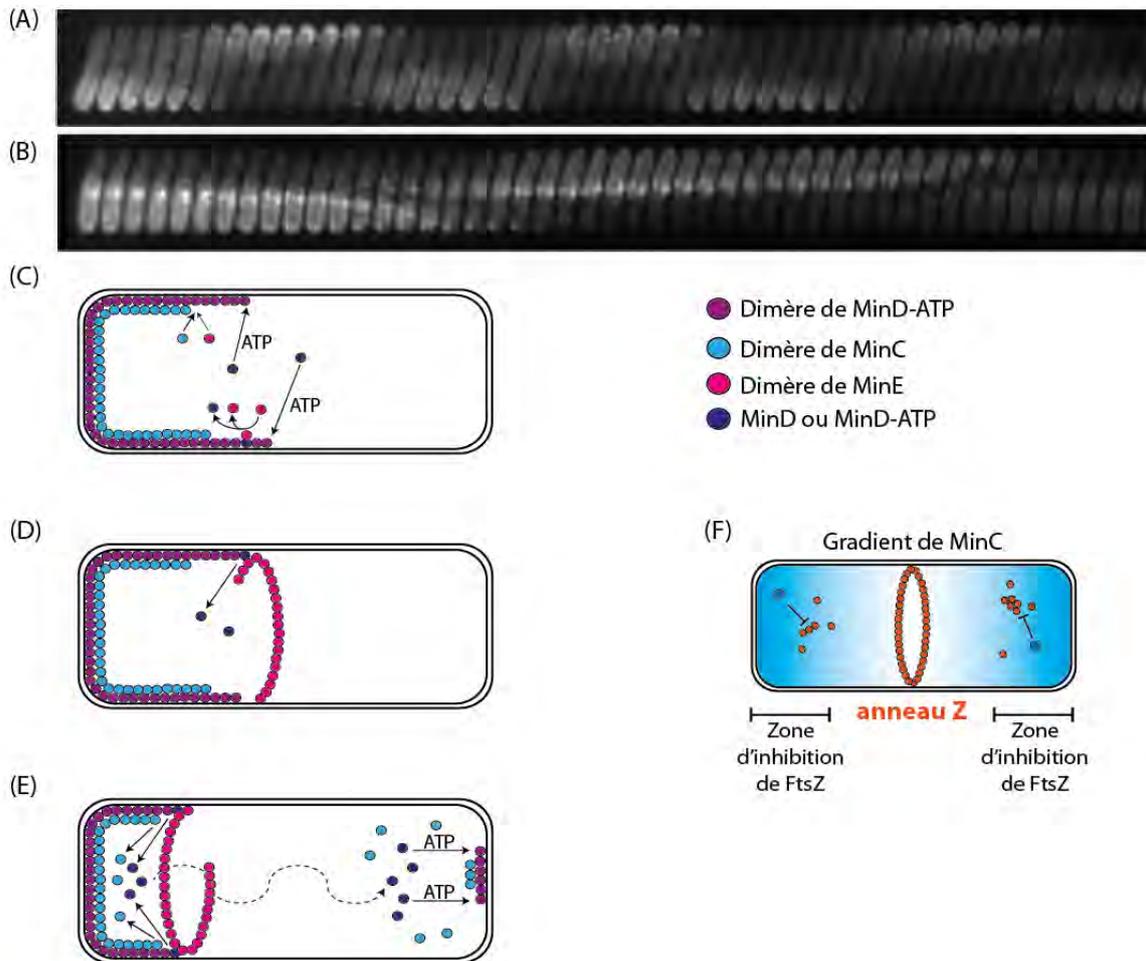


Figure 34 : Le système MinCDE

(A) MinD-GFP oscille d'un pôle à l'autre avec une périodicité de 60 secondes environ. (B) L'anneau de MinE-GFP se déplace du centre de la cellule vers l'un des pôles, puis de nouveau du centre de la cellule vers l'autre pôle (C) **Assemblage de la zone polaire MinD** : MinD-ATP se lie à la membrane sous forme de dimères, MinC interagit avec MinD lié à la membrane avec une forte affinité, MinE peut interagir avec MinD avec une faible affinité et stimuler son activité ATPasique et donc son décrochage de la membrane. (D) **Formation de l'anneau MinE** : l'anneau de MinE se forme au centre de la cellule, MinE stimule l'activité ATPasique de MinD, provoquant le décrochage de la membrane de MinD. (E) **Désassemblage de la zone polaire MinD** : la progression de l'anneau MinE du centre vers le pôle provoque le désassemblage de la zone polaire, les molécules de MinD relargées migrent vers l'autre pôle et une nouvelle zone polaire commence à s'assembler, l'anneau de MinE se désagrège lorsque la zone polaire a disparue (D'après Shih and Zheng, 2013) (F) L'oscillation du système créé un gradient de concentration de MinC. MinC inhibe la formation de l'anneau Z. L'anneau Z ne peut se former aux pôles de la cellule.

L'oscillation du système Min peut être découpée en 4 étapes clefs, qui dépendent du déplacement de l'équilibre entre les différentes interactions (Figure 34) :

- [Assemblage de la zone polaire MinD](#)

L'assemblage est initié à l'un des pôles de la cellule et s'étend en direction de centre de la cellule. La fixation coopérative de MinD-ATP à la membrane et sa capacité à dimériser permettent cet assemblage. MinC et MinE se lient à MinD dans la zone polaire. Cependant, la liaison de MinC à MinD est beaucoup plus forte que la liaison de MinE à MinD. MinE ne se lie à MinD que de manière très transitoire, et est relargée après stimulation de l'activité ATPasique de MinD (Hu et al., 2003) (Figure 34C).

- [Formation de l'anneau MinE](#)

Lorsque la zone polaire est entièrement assemblée et recouvre la moitié de la cellule, l'anneau E se forme et recouvre le bord médial de la zone polaire. MinD étant nécessaire pour la formation de l'anneau E, on suppose que MinE est liée à la membrane grâce à l'interaction avec MinD (Raskin and de Boer, 1997). Cette interaction stimule l'activité ATPasique de MinD et donc son détachement de la membrane. Cependant, l'anneau de MinE reste, quant à lui, ancré à la membrane après la dissociation de MinD, grâce à son domaine N-terminal de liaison à la membrane (Raskin and de Boer, 1997; Shih et al., 2011). L'attachement de MinE au centre de la cellule plutôt qu'autre part est favorisé par les propriétés physico-chimiques de la membrane : la courbure, la tension et la composition phospholipidique (Figure 34D).

- [Désassemblage de la zone polaire MinD](#)

La formation de l'anneau E au centre de la cellule empêche la propagation de la zone polaire MinD et initie son désassemblage. MinD est dissociée de la membrane via la stimulation de l'activité ATPasique par l'anneau E et les changements de conformation associés. Les molécules de MinD relarguées diffusent vers le pôle opposé et commencent à s'assembler pour former une nouvelle zone polaire MinD.

L'anneau E se déplace du centre de la cellule vers le pôle, au fur et à mesure qu'il y a dissociation de MinD, permettant ainsi à l'anneau E de rester en contact avec le bord médial de la zone polaire. Deux hypothèses peuvent expliquer ce déplacement : (i) il pourrait y avoir rétention des molécules de MinE à la membrane pour couvrir les trous laissés par la dissociation de MinD, et donc mouvement coopératif des toutes les molécules de MinE formant l'anneau ou (ii) les molécules de MinE pourraient être de nouveau recrutées par les molécules de MinD encore présentes au niveau de la zone polaire afin de former un nouvel anneau E au niveau du bord médial (Figure 34E).

- Désassemblage de l'anneau E

Une fois que la zone polaire MinD est complètement désassemblée, il y a disparition de l'anneau E. La dissociation de MinD et MinE de la membrane devient l'activité dominante comparée à l'activité de liaison à la membrane et toutes les autres activités d'auto-interactions.

Cette oscillation rapide de MinD et MinE crée un gradient de concentration de MinC dans la cellule (Figure 34F). MinC est, la grande majorité du temps, présente au pôle de la cellule, et toujours absente du centre de la cellule. Et comme MinC empêche la formation de l'anneau Z par déstabilisation des interactions longitudinales et latérales au sein des protofilaments, l'anneau Z ne peut se former que dans la zone dépourvue de MinC, soit la région centrale de la cellule.

2.6.2.2. Le système d'occlusion par le nucléoïde médié SImA

Le système Min restreint la formation de l'anneau Z à la zone centrale de la cellule. Cependant, ce système n'est pas suffisant pour éviter le guillotinage du chromosome, étant donné que les chromosomes sont présents au centre de la cellule pendant la majeure partie du cycle cellulaire. Et ce système n'est pas non plus suffisant pour expliquer que l'anneau Z se forme précisément au centre de la cellule. C'est pour ça qu'un second système permettant de contrôler la formation de l'anneau Z existe chez *E. coli* : le système d'occlusion par le nucléoïde médié par la protéine SImA.

Le gène *slmA* a été mis en évidence grâce à un criblage génétique permettant de trouver des mutants synthétiques létaux avec un système Min déficient, d'où le nom *slmA* pour « *Synthetically Lethal with a defective Min system* » (Bernhardt and de Boer, 2005). Ce même type de screen a été utilisé précédemment chez *Bacillus subtilis* pour mettre en évidence le facteur d'occlusion par le nucléoïde Noc (Wu and Errington, 2004). SlmA, comme Noc, se fixe à l'ADN et inhibe la mise en place de l'anneau Z. Malgré une homologie de fonction, SlmA et Noc ne présentent aucune homologie de séquences et appartiennent à deux familles différentes de protéines de liaison à l'ADN. Les protéines Noc et SlmA sont probablement un bel exemple d'évolution convergente chez deux espèces distinctes : *B. subtilis* et *E. coli*.

SlmA est une protéine de liaison à l'ADN qui reconnaît spécifiquement les sites SBS (pour SlmA Binding Site), présents tous le long du chromosome, hormis dans la région *ter* (Figure 7) (Cho et al., 2011; Tonthat et al., 2011). SlmA est active uniquement lorsqu'elle se fixe sur ses sites SBS. La distribution biaisée des sites SBS sur le chromosome permet d'empêcher la formation de l'anneau Z au-dessus du chromosome, mais autorise la formation de l'anneau Z à proximité de la région *ter*. La région *ter* est localisée au centre de la cellule à la fin du cycle cellulaire, et y reste pendant l'assemblage du divisome (voir partie 3.1.3.2).

Deux modèles moléculaires ont été proposés pour expliquer l'inhibition de la formation de l'anneau Z par SlmA :

- [Modèle de la dépolymérisation des filaments de FtsZ par SlmA](#)

In vitro, on observe une dépolymérisation des filaments de FtsZ uniquement lorsque SlmA est liée à l'ADN au niveau d'un site SBS (Cho et al., 2011; Cho and Bernhardt, 2013). La dépolymérisation de FtsZ aurait donc lieu partout au niveau du nucléoïde, sauf dans la région terminale du chromosome. La dépolymérisation de FtsZ par SlmA semble se faire en deux étapes : dans un premier temps SlmA interagirait avec le « hub » de FtsZ et entrerait en compétition avec les autres régulateurs de FtsZ (notamment MinC et ClpX) et les partenaires de FtsZ permettant l'ancrage à la membrane et la stabilisation de FtsZ (notamment ZipA, FtsA et ZapD).

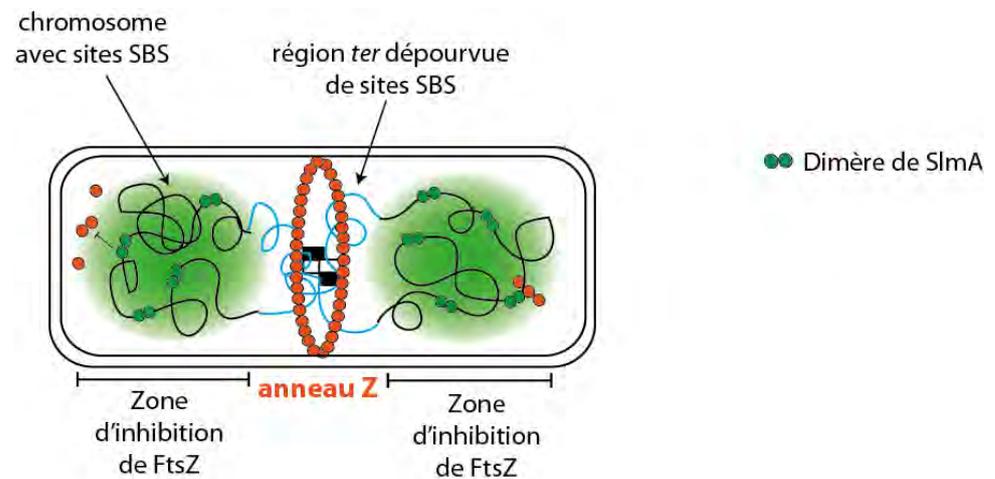


Figure 35 : Le système d'occlusion par le nucléoïde SlmA

SlmA se fixe sur les sites SBS. Cette fixation empêche la formation de l'anneau Z au niveau du chromosome portant des sites SBS. L'anneau Z peut se former au niveau de la région *ter* du chromosome, dépourvue de sites SBS, et donc de SlmA. SlmA empêche la formation de l'anneau Z soit par capture des filaments de FtsZ, rendant l'assemblage de l'anneau Z impossible, soit par dépolymérisation des filaments de FtsZ.

Dans un second temps SlmA interagirait avec un autre domaine de FtsZ, et cette interaction provoquerait la rupture des filaments de FtsZ (Du and Lutkenhaus, 2014). Une étude récente montrant que SlmA, sous forme de dimère sur un site SBS, réduit le temps de demi-vie des protofilaments de FtsZ en solution, sans la moindre modification de l'activité ATPasique de FtsZ, vient conforter ce modèle (Cabré et al., 2015).

- [Modèle de la capture des filaments de FtsZ par SlmA](#)

Un autre modèle propose que SlmA ne provoque pas la dépolymérisation des protofilaments, mais les captures, rendant impossible la formation de l'anneau Z. SlmA se fixerait sous forme de dimère de dimères. Cette fixation permettrait la diffusion de SlmA autour du site SBS et la formation d'une structure hautement ordonnée de SlmA permettant de capturer les filaments de FtsZ, et rendant donc impossible l'assemblage des filaments pour permettre la formation d'un anneau Z (Tonthat:2011jh ; Tonthat et al., 2013). Ce modèle est soutenu par le fait qu'il y a beaucoup plus de molécules de SlmA par cellules (500 dimères environ) que de sites SBS sur le chromosome (entre 24 et 52 sites) (Cho et al., 2011; Tonthat et al., 2011). Cependant, l'observation en microscopie à fluorescence de protéines de fusions n'a pas permis de mettre en évidence une colocalisation entre des protofilaments de FtsZ et des structures étendues de SlmA (Tonthat et al., 2013; 2011)

Quel que soit le mécanisme d'action de SlmA, il est évident que SlmA empêche la formation de l'anneau Z dans les zones de la cellule où se trouve le nucl o ide, sauf au niveau de la région *ter* (Figure 35). En présence de SlmA et du système MinCDE, l'anneau Z ne peut se former qu'au centre de la cellule. SlmA et MinCDE sont donc des régulateurs négatifs. Ces dernières années, deux études ont montré que les systèmes MinCDE et SlmA n'étaient pas indispensables au positionnement correcte de l'anneau Z en condition lente de croissance, ou lorsque les cellules avec des phénotypes morphologiques particuliers (Bailey et al., 2014; Männik et al., 2012). Il existerait donc un système alternatif permettant le positionnement correct de l'anneau Z au centre de la cellule, dépendant de MatP, ZapA et ZapB. Ce système, appelé » *Ter Linkage* » est un régulateur positif de la formation de l'anneau Z (voir partie 3.3).

2.6.3. Les autres protéines du divisome

La formation de l'anneau Z au centre de la cellule est la première étape de la mise en place du divisome. Une fois l'anneau Z formé, il y a recrutement des protéines dites « précoces » du divisome, puis ensuite recrutement des protéines dites « tardives ». Nous allons voir dans cette partie dans quel ordre sont recrutées ces protéines, et quels sont leurs rôles dans la division cellulaire.

2.6.3.1. Les protéines d'ancrage à la membrane

FtsA et ZipA sont les deux premières protéines à être recrutées au centre de la cellule après la formation de l'anneau Z (Figure 32). Elles sont toutes les deux essentielles chez *E. coli*. Leur localisation au futur site de division de la cellule est dépendante de la présence de FtsZ et elles participent toutes les deux à l'ancrage à la membrane de l'anneau Z, prérequis essentiel à la constriction du septum par FtsZ.

- FtsA

FtsA est une protéine cytoplasmique très conservée chez de nombreuses espèces bactériennes. Elle se lie à la membrane plasmique via une hélice amphipatique en C-terminale. L'obtention de la structure cristallographique de FtsA de *Staphylococcus aureus* (Fujita et al., 2014) et *Thermotoga maritima* (van den Ent and Löwe, 2000) a permis de mettre en évidence l'existence de deux domaines (domaines 1 et 2) subdivisés en deux sous-domaines (sous-domaines 1A, 1C, 2A et 2B). Les sous-domaines 1A, 2A et 2B forment le site de liaison à l'ATP alors que le domaine 2B interagit avec le domaine « hub » de FtsZ (Szwedziak et al., 2012). Le domaine 1C, quant à lui, joue un rôle essentiel dans le recrutement d'autres protéines du division (FtsK, FtsQ, FtsL, FtsI et FtsN) ainsi que dans l'interaction FtsA-FtsA (Rico et al., 2004). FtsA permet l'ancrage à la membrane de l'anneau Z, et semble aussi jouer un rôle dans la réorganisation des filaments de FtsZ en les déstabilisant (Loose and Mitchison, 2014). Cette réorganisation des protofilaments de FtsZ au sein de l'anneau Z pourraient être à l'origine de la diminution du diamètre de l'anneau Z, et pourrait donc permettre la constriction du septum.

- ZipA

ZipA possède un petit domaine périplasmique en N-terminal, une seule hélice transmembranaire et un large domaine cytoplasmique. Le domaine cytoplasmique est composé, entre autre, d'un domaine globulaire interagissant avec le « *hub* » de FtsZ à l'extrémité C-terminal (Mosyak et al., 2000). Cette interaction protège FtsZ de la dégradation par le complexe protéasique ClpXP. ZipA ne peut être remplacée par aucune autre protéine du divisome, et est donc essentielle à la stabilisation de l'anneau Z (Pazos et al., 2013b).

Contrairement à FtsA qui n'interagit qu'avec les polymères de FtsZ, ZipA peut interagir avec les polymères de FtsZ mais aussi avec FtsZ sous forme monomérique. L'affinité de liaison de ZipA pour FtsZ est grande, ce qui permet le recrutement de FtsZ sous forme de monomère alors que l'affinité de liaison de FtsA pour FtsZ est beaucoup plus faible, et nécessite donc la formation de multiple liaisons au niveau d'un polymères de FtsZ pour établir une interaction stable (Loose and Mitchison, 2014).

2.6.3.2. Les protéines stabilisatrices de l'anneau Z

Les protéines Zap (pour FtsZ Ring-Associated Proteins) ZapA, ZapB, ZapC et ZapD interviennent dans les premières étapes de l'assemblage du divisome, elles sont donc dites « précoces ». Leur localisation au centre de la cellule dépend de la présence de FtsZ. Les protéines Zap ne présentent aucune homologie de séquences entre elles et aucune n'est essentielle à la viabilité cellulaire.

- ZapA

ZapA est la protéine Zap la plus conservée parmi les espèces bactériennes. ZapA est composé d'un domaine N-terminal globulaire et d'un long domaine « *coiled-coil* » en C-terminal (Low et al., 2004). Le domaine N-terminal participe à la multimérisation de ZapA. A faible concentration ZapA est sous forme dimérique, et à forte concentration sous forme tétramérique. La tétramérisation se fait par association anti-parallèle des deux domaines « *coiled-coil* » (Low et al., 2004).

In vitro, ZapA empêche l'activité GTPase de FtsZ et favorise les interactions latérales entre les protofilaments de FtsZ (Small et al., 2007). De plus, ZapA est en compétition avec MinC, qui empêche les interactions latérales entre protofilaments, pour la liaison à FtsZ, ce qui est compatible avec un rôle de ZapA dans la stabilisation de l'anneau Z (Dajkovic et al., 2008).

- ZapB

ZapB est conservée uniquement chez les γ -protéobactéries. ZapB est une protéine « *coiled-coil* » qui s'oligomérisse et forme spontanément de long filaments. ZapB, une fois assemblée en longs filaments, interagit avec ZapA et FtsA (Galli and Gerdes, 2012). L'interaction ZapA-ZapB se fait entre le domaine C-terminal « *coiled-coil* » de ZapA et le domaine N-terminal de ZapB (Galli and Gerdes, 2012). L'interaction de ZapB avec l'anneau Z est médiée par ZapA, mais peut aussi se faire directement, dans une souche $\Delta zapA$ (Pazos et al., 2013a). ZapB permet de stabiliser l'anneau Z, en présence ou en absence de ZapA (Ebersbach et al., 2008; Galli and Gerdes, 2012). De plus, ZapB ancrée à l'anneau Z via ZapA interagit avec la protéine MatP, et participe au maintien de la région terminale au centre de la cellule à la fin du cycle cellulaire (voir partie 3.1.3.2) (Espéli et al., 2012).

- ZapC

Comme ZapB, ZapD est conservée chez les γ -protéobactéries. ZapC n'est pas essentielle pour la viabilité cellulaire. La délétion de *zapC* en absence de ZapA et/ou ZapB conduit à une élongation de cellules. De plus, les souches délétées de *zapC* sont plus sensibles à une surexpression de MinC. Ces deux arguments suggèrent un rôle de ZapC dans la stabilisation de l'anneau Z (Durand-Heredia et al., 2012; Hale et al., 2011). *In vitro*, ZapC, comme ZapA, favorise les interactions latérales entre protofilaments de FtsZ et inhibe l'activité GTPase de FtsZ (Hale et al., 2011). ZapC n'est pas nécessaire à la localisation au septum de ZapA et ZapB. Et réciproquement, la localisation de ZapC au niveau de l'anneau Z ne dépend pas de la localisation de ZapA, ZapB ou ZipA (Hale et al., 2011).

- ZapD

ZapD est conservée chez les γ -protéobactéries mais aussi chez une partie des β -protéobactéries. La surexpression de ZapD provoque des défauts de division cellulaire dus à la formation d'anneaux Z aberrants hyper stables. De plus, la délétion de *zapD* dans une souche portant la mutation FtsZ84 (produit une protéine FtsZ thermosensible ne pouvant pas polymériser à température permissive) induit une baisse de viabilité et la formation de cellules filamenteuses (Durand-Heredia et al., 2012). *In vitro*, ZapD, comme ZapA et ZapC, favorise les interactions latérales entre les protofilaments de FtsZ et diminue l'activité GTPase de FtsZ (Durand-Heredia et al., 2012). ZapD participe à la stabilisation de l'anneau Z en interagissant avec le « *hub* » de FtsZ.

2.6.3.3. Les protéines tardives du divisome

Une fois l'anneau Z placé correctement au centre de la cellule, ancré à la membrane grâce à l'action de FtsA et de ZipA, et stabilisé grâce aux protéines d'ancrages mais aussi grâce aux protéines Zap, il va y avoir recrutement d'au moins 7 autres protéines dites « tardives » au niveau de l'anneau Z. Ces protéines sont nécessaires à la formation d'un divisome mature et donc à la séparation de la cellule mère en deux cellules filles.

- FtsK

FtsK est la première protéine dite « tardive » à être recrutée au niveau de l'anneau Z stabilisé. FtsK est une protéine multifonctionnelle bien conservée chez les différentes espèces bactériennes. Elle est divisée en un domaine N-terminal contenant quatre segments transmembranaires, une longue région non structurée centrale, le « linker » et un domaine C-terminal cytoplasmique. Le domaine N-terminal est impliquée dans la division cellulaire, et faire partie du divisome, alors que le domaine C-terminal, quant à lui, intervient dans la ségrégation de la région terminale du chromosome, la résolution des dimères de chromosomes et la décaténation des chromosomes.

Toutes ses fonctions concernant les étapes tardives du cycle cellulaire et ayant lieu dans la région terminale du chromosome seront détaillées dans la troisième partie. Seul le domaine N-terminal faisant partie du divisome sera traité ici.

Le domaine N-terminal, contrairement au domaine C-terminal, est essentiel (Draper et al., 1998). Il permet à FtsK de se localiser au septum de division. Après recrutement au septum, le domaine N-terminal est présent uniquement sous forme d'hexamère (avec une moyenne de 7 hexamères par cellule). L'hexamérisation du domaine N-terminal est indépendante de l'hexamérisation du domaine C-terminal et intervient avant la constriction du septum (Bisicchia et al., 2013). La localisation de FtsK au septum nécessite la présence de FtsZ, FtsA et ZipA (Wang and Lutkenhaus, 1998). Le début du « *linker* » semble aussi impliqué dans la division cellulaire. Il serait important pour la stabilisation des interactions entre FtsK et les autres protéines du divisome (Bigot et al., 2004). FtsK pourrait aussi contrôler les étapes tardives de la synthèse du septum de division via son interaction avec FtsI (Lesterlin et al., 2008). La délétion du domaine N-terminal peut être compensée par une surexpression de FtsZ, FtsQ, FtsN et FtsA (Draper et al., 1998; Geissler and Margolin, 2005; Goehring et al., 2007).

- FtsQ, FtsB et FtsL

FtsQ, FtsB et FtsL sont recrutées après FtsK et forment un complexe trimérique (Glas et al., 2015). Ce complexe participe ensuite au recrutement de FtsW et des PBP permettant la synthèse du peptidoglycane septal. Elles sont nécessaires à la maturation de l'anneau septal (Gonzalez et al., 2010; Gonzalez and Beckwith, 2009).

FtsQ est une protéine bitopique composée d'une extension cytoplasmique d'une vingtaine d'acides aminés en N-terminal, d'un segment transmembranaire et d'un domaine C-terminal périplasmique (Carson et al., 1991). FtsQ est une protéine charnière du divisome, elle permet de faire le lien entre les protéines périplasmiques et les protéines cytoplasmiques. En effet, elle interagit avec FtsA et FtsK via sa courte extension cytoplasmique, et avec FtsL, FtsB, FtsI, et FtsN via son domaine C-terminal périplasmique et/ou son segment transmembranaire (Buddelmeijer and Beckwith, 2004).

FtsL et FtsB sont elles aussi des protéines bitopiques. Elles localisent au septum de division de manière co-dépendante, et sont essentielles à la viabilité cellulaire (Buddelmeijer et al., 2002). Le rôle précis de ces deux protéines dans la division cellulaire n'est à ce jour pas défini.

- FtsW

Au même titre que FtsL et FtsB, le rôle de FtsW dans la division cellulaire est encore flou. FtsW est une protéine de la famille des SEDS (pour Shape Elongation Division and Sporulation) et possède 10 domaines transmembranaires (Ikeda et al., 1989). Le gène *ftsW* est en opéron avec le gène *ftsI*, codant pour la protéine FtsI. Au vu de ces éléments, il est probable que FtsW serve de protéine d'adressage à la membrane pour FtsI (Mercer and Weiss, 2002).

- FtsI

FtsI, aussi appelée PBP3 est une protéine impliquée dans la synthèse du peptidoglycane septal. Elle est composée de trois domaines : un domaine cytoplasmique en N-terminal, une hélice transmembranaire et un domaine C-terminal périplasmique. Le domaine C-terminal est subdivisé en deux sous-domaines : un domaine non-catalytique de fonction inconnue et un domaine catalytique à activité transpeptidase responsable de la formation de ponts dans le peptidoglycane septal (Wissel and Weiss, 2004). Elle est adressée à la membrane via FtsW et est nécessaire à la localisation de FtsN au niveau du septum de division (Wissel and Weiss, 2004).

- FtsN

FtsN est aussi une protéine bitopique, comme FtsQ, FtsL, FtsB et FtsN. Elle possède un seul fragment transmembranaire, impliqué uniquement dans la localisation à la membrane de la protéine. La fonction de FtsN semble portée par le large domaine périplasmique en C-terminal, mais n'est pas connue à l'heure actuelle. Comme de nombreuses autres protéines du divisome, FtsN semble aussi jouer un rôle dans la stabilisation du complexe de division (Goehring et al., 2006).

2.6.4. Clivage du peptidoglycane

Après le recrutement des différentes protéines du divisome, et la synthèse du peptidoglycane septal, la dernière étape nécessaire à la formation de deux cellules filles à partir d'une cellule mère est le clivage du peptidoglycane. Chez *E. coli*, le clivage se fait de manière concomitante avec la fermeture du septum de division, d'où la forme typique en V de la constriction observable en microscopie.

2.6.4.1. Rôle des hydrolases

Chez *E. coli*, il existe de multiples hydrolases putatives du peptidoglycane pouvant être impliquées dans le clivage du peptidoglycane au moment de la fermeture du septum. Seulement, compte tenu de la redondance de ces hydrolases, il est difficile de déterminer lesquelles sont précisément impliquées dans ce processus. Une amidase semble toutefois particulièrement importante dans ce processus. Il s'agit d'AmiC, qui se localise au niveau du septum de division (Bernhardt and de Boer, 2003). Sa localisation au septum est dépendante de la présence de la protéine FtsN, et AmiC est donc à l'heure actuelle la dernière protéine connue à être recrutée au septum au cours de la division cellulaire. Dans une souche $\Delta amiC$, on observe une séparation imparfaite des cellules filles, avec 20 à 30% des cellules formant des chaînettes composée de 3 à 6 cellules non séparées (Bernhardt and de Boer, 2003).

2.6.4.2. Contrôle de l'activité des hydrolases

Afin de ne pas créer de lésions du peptidoglycane autre part qu'au niveau du septum de division, l'activité des hydrolases doit être contrôlée dans le temps, et dans l'espace. Seules, les hydrolases ne sont pas actives. L'hydrolyse de peptidoglycane nécessite l'activation des hydrolases par des protéines associées au divisome possédant un domaine LytM : EnvC et NlpD (Uehara et al., 2010). EnvC active spécifiquement AmiA et AmiB alors que NlpD active spécifiquement AmiC (Uehara et al., 2009).

Afin que l'activité des hydrolases soit coordonnée avec l'invagination de la membrane et la synthèse du peptidoglycane, il est nécessaire que l'activité des protéines EnvC et NlpD, qui

activent les hydrolases, soit elle-même contrôlée. Le complexe FtsE/FtsX semble jouer ce rôle de régulateur de l'activité des hydrolases au septum de division. En effet, il a été mis en évidence que ce complexe permet le recrutement d'EnvC au niveau du septum de division grâce à une interaction directe entre EnvC et une boucle périplasmique de FtsX (D. C. Yang et al., 2011). Ce recrutement ne nécessite pas l'hydrolyse de l'ATP par FtsE, puisqu'EnvC est toujours recrutée au septum lorsqu'un mutant déficient en hydrolyse est utilisé. En revanche, lorsque ce mutant est utilisé, il n'y a plus d'activation des hydrolases par EnvC (D. C. Yang et al., 2011). Cela suggère que l'activation des hydrolases par EnvC nécessite un changement conformationnel du complexe FtsEX nécessitant l'hydrolyse de l'ATP par FtsE. De plus, le complexe FtsEX est localisé au septum de division grâce à une interaction entre FtsE et FtsZ. Le complexe FtsEX semble donc pouvoir coupler l'activité des hydrolases avec la constriction du septum, via EnvC.

Il reste cependant encore de nombreuses zones d'ombre concernant la mise en place du septum de division et le clivage du peptidoglycane entre les deux cellules filles. En effet, les rôles et les mécanismes d'action de nombreuses protéines du divisome n'ont pas été caractérisés. De même, parmi les hydrolases putatives du peptidoglycane identifiées chez *E. coli*, il est plus que probable que d'autres soient impliquées dans le clivage du peptidoglycane septal. De plus, il reste aussi probablement d'autres protéines impliquées dans la division cellulaire à découvrir.

3. Zoom sur la région terminale du chromosome

Dans cette troisième et dernière partie, nous allons étudier en détail la région terminale (*ter*) du chromosome d'*E. coli*. En effet, cette région du chromosome est particulièrement intéressante, car, contrairement au reste du chromosome, elle n'est pas ségrégée au fur et à mesure de la ségrégation, mais après une période de cohésion post-réplivative étendue. De plus, elle est le siège des dernières étapes nécessaires à la ségrégation correcte des deux chromosomes frères : la résolution des dimères de chromosome et la résolution des liens d'intercaténations. Elle fait aussi le lien entre le chromosome et la division cellulaire.

3.1. MatP : La Protéine centrale du MacroDomaine Ter

3.1.1. Découverte de MatP

Nous avons vu précédemment que le chromosome est subdivisé en 4 grands domaines structurés d'environ 1 Mb appelés MacroDomaines Ori, Right, Left et Ter (voir partie 1.4). De plus, certains motifs ADN sont cantonnés à un seul de ces MacroDomaines. C'est le cas des sites *matS*, que l'on ne retrouve que dans le MacroDomaine Ter (=région *ter*) (voir partie 1.2.2.3). Les sites *matS*, palindromes incomplets de 13pb, sont au nombre de 23 dans la région *ter* (Figure 6). Ils ont été mis en évidence en 2008, par une approche statistique, du fait de leur hyper représentativité dans la région *ter* et de leur absence sur le reste du chromosome (= les régions non-*ter*) (Mercier et al., 2008).

Dans cette même étude, il a été mis en évidence par EMSA sur des extraits bruts d'*E. coli* qu'un facteur se liait spécifiquement sur les sites *matS*. Afin d'identifier le gène codant ce facteur, un système de sélection basé sur la sensibilité à la streptomycine a été utilisé. Un site *matS* a été placé dans le promoteur d'un gène conférant la sensibilité à la streptomycine. La fixation d'une protéine sur le site *matS* entraîne une diminution de l'expression de ce gène, et donc une diminution de la sensibilité à la streptomycine. La souche a ensuite été transformée avec une banque d'ADN génomique multicopie et les transformants présentant une sensibilité à la streptomycine diminuée ont été analysés.

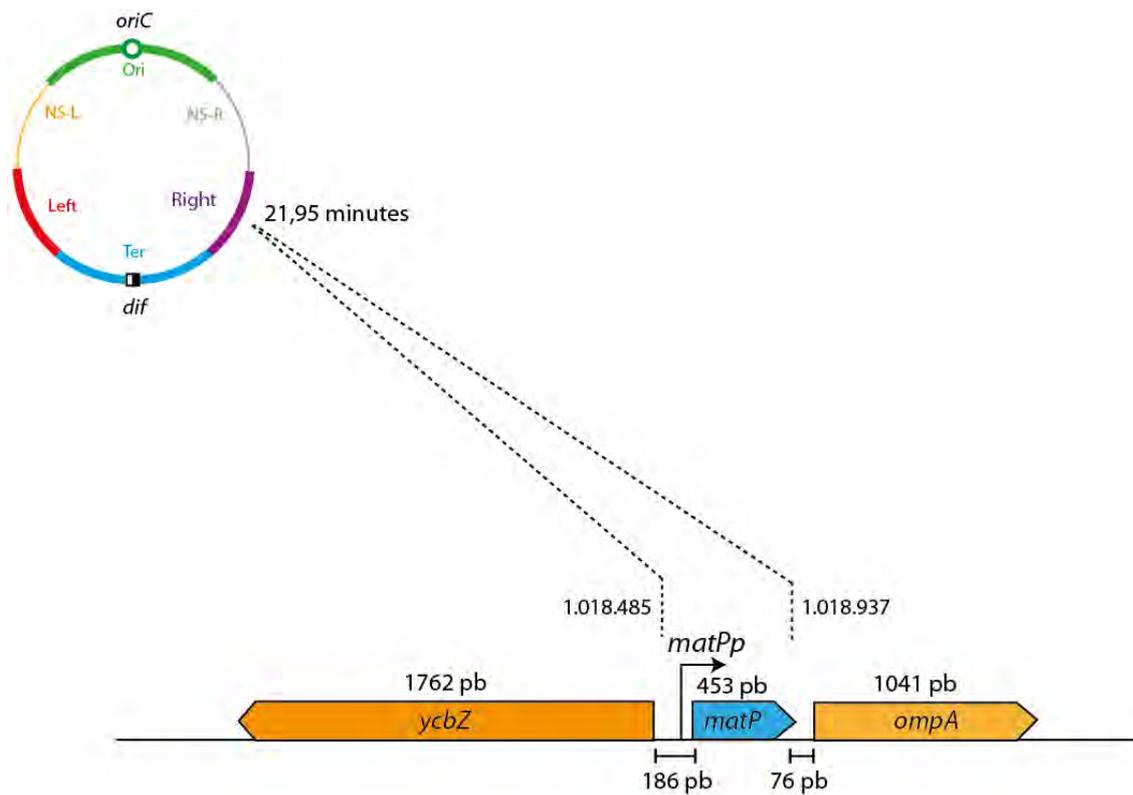


Figure 36 : Le gène *matP*

Le gène *matP*, de 453 pb, est sous le contrôle de son propre promoteur *matPp*. Il est situé dans le MacroDomaine Right, à 21,95 minutes. Il est entouré des gènes *ycbZ*, codant une protéase ATP dépendante putative, et *ompA*, codant une porine de la membrane externe.

Tous contenaient la même région génomique, et un seul ORF complet a été trouvé : *ycbG*. Le gène *ycbG* a été renommé *matP* (Mercier et al., 2008).

3.1.2. Présentation de MatP

3.1.2.1. Le gène *matP*

Le gène *matP* est sous la dépendance de son propre promoteur *matPp*. C'est un gène de 453 pb situé dans le MacroDomaine Right (entre les positions 1.018.485 et 1.018.937, soit à 21,95 minutes). Il n'est pas organisé en opéron, et les deux gènes qui l'entourent (*ycbZ* et *ompA*) sont en orientation inverse (Figure 36). Le gène *ycbZ* de 1761 pb code une protéase ATP-dépendante putative. Le gène *ompA* de 1041 pb code une porine de la membrane externe. L'environnement génomique du gène *matP*, ainsi que la connaissance de son promoteur n'apporte pas plus d'informations quant à la régulation de son expression ou à son histoire évolutive.

3.1.2.2. La protéine MatP

- Conservation de MatP

Le gène *matP* code pour une protéine de 150 aa : MatP. La protéine MatP est conservée dans trois ordres des des γ -protéobactéries : les Enterobacterales, les Vibrionales et les Pasteurellales. Sur InterPro (EMBL-EBI), on trouve à l'heure actuelle 880 protéines appartenant à la famille MatP chez les Enterobacterales, 172 chez les Vibrionales et 126 chez les Pasteurellales. MatP appartient à un groupe de protéines identifiées exclusivement dans des bactéries avec une activité Dam méthyltransférase. Dans ce groupe de protéines, on retrouve aussi SeqA, MukBEF, et TidP (protéine insulatrice du MacroDomaine Ter) (Thiel et al., 2012), qui ont toutes un rôle dans l'organisation du nucléoïde pendant les différents processus du cycle cellulaire (Brézellec et al., 2006)

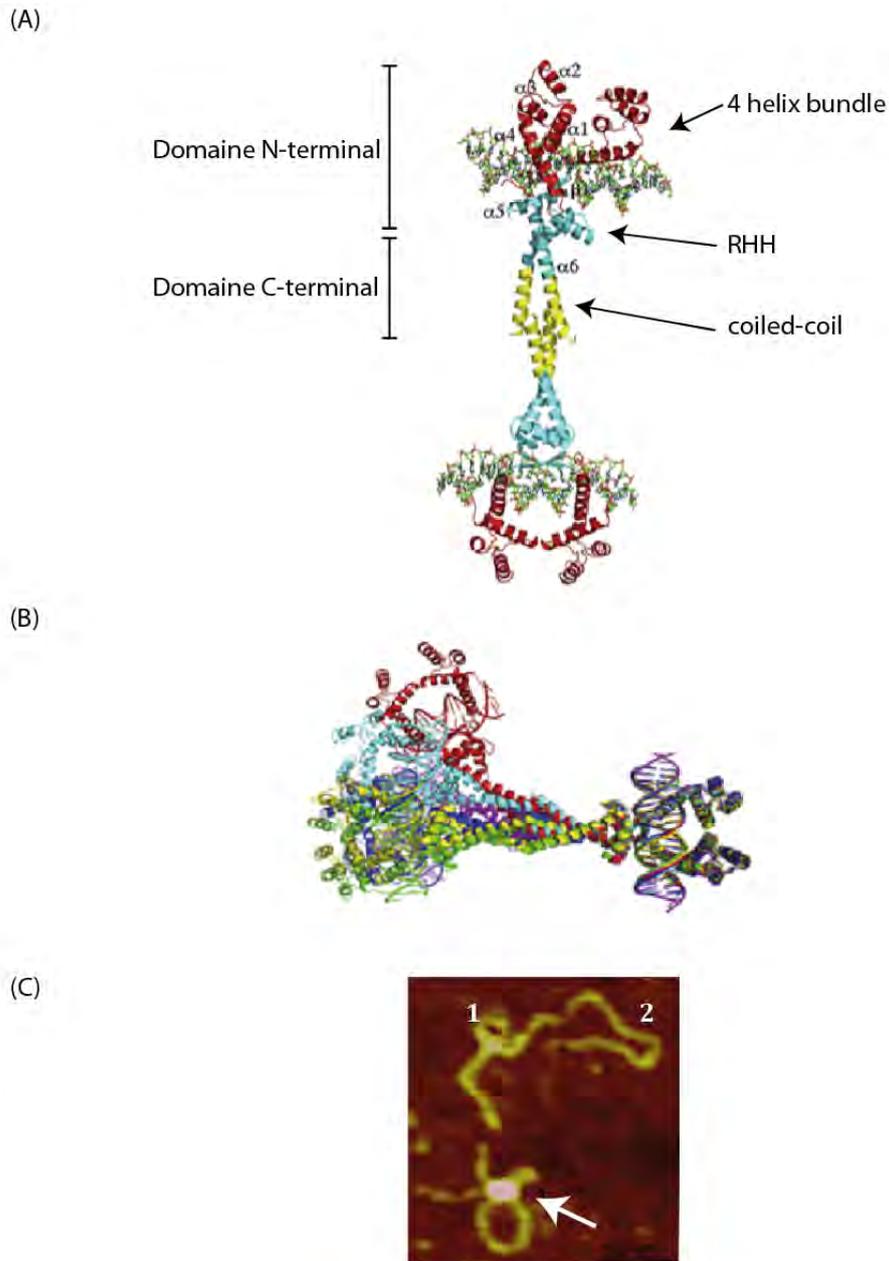


Figure 37 : Structure de MatP

(A) Représentation schématique d'un tétramère de MatP avec deux sites *matS*. Les domaines «4 helix bundle», «RHH» et «coiled-coil» sont représentés en rouge, bleu et jaune respectivement. (B) La superposition des régions RHH et «4 helix bundle» d'un des dimères de chaque structure MatP-*matS* obtenue indépendamment (4 structures pour MatP de *Y. pestis* et 2 structures pour MatP d'*E. coli*) permet de mettre en évidence la flexibilité du tétramère au niveau du domaine «coiled-coil». (C) Image en AFM de MatP d'*E. coli* liée sur une molécule d'ADN de 900pb contenant deux sites *matS*. 1 et 2 correspondent aux emplacements des sites *matS* sur un ADN non lié par MatP. La flèche correspond à une région de haute densité de MatP. Il y a formation d'une boucle entre les deux sites *matS*. (D'après Dupaigne *et al.*, 2012)

- Structure de MatP

MatP est une protéine de 17 KDa qui ne présente aucune homologie de séquence avec d'autres protéines précédemment caractérisées. Plusieurs structures de MatP liée à un site *matS* ont été obtenues : 3 pour MatP de *Yersinia pestis* (résolution comprise entre 2,55 Å et 3,50 Å) et 1 pour MatP d'*E. coli* (3,55 Å) (Dupaigne et al., 2012).

MatP est composée d'un domaine N-terminal de type « *4-helix bundle* » et d'un domaine C-terminal de type « *coiled-coil* » séparés par une structure de type « *ribbon-helix-helix* » (RHH) (Figure 37A). Les domaines « *4-helix bundle* » et RHH sont identiques dans toutes les structures obtenues alors que le domaine « *coiled-coil* » présente une flexibilité et une orientation variable entre les structures (Figure 37B) (Dupaigne et al., 2012).

L'obtention de la structure de MatP a permis de mettre en évidence que MatP se fixe sous forme de dimère sur les sites *matS*. La dimérisation de MatP se fait au niveau du domaine RHH. Concernant la liaison au niveau d'un site *matS*, deux domaines sont impliqués : le domaine « *4-helix bundle* » et le domaine RHH. Les deux domaines « *4-helix bundle* » du dimère interagissent avec le sillon majeur aux deux extrémités du site *matS* alors que les domaines RHH interagissent avec le sillon majeur de la partie centrale du site *matS*. (Dupaigne et al., 2012). La spécificité d'interaction entre un dimère de MatP et un site *matS* est due aux contacts base-spécifiques du domaine « *4-helix bundle* ». Le domaine RHH, quant à lui, possède de nombreux résidus qui vont interagir de façon non spécifique avec les phosphates du sillon majeur.

La tétramérisation de MatP se fait, quant à elle, au niveau des domaines « *coiled-coil* », entre deux dimères. Quatre résidus hydrophobes sont impliqués dans la formation du domaine « *coiled-coil* » et de ce fait dans la formation du tétramère de MatP (les leucines 139, 143 et 146 et l'isoleucine 147). Le tétramère ainsi formé est flexible (Figure 37B). Cette flexibilité est due à la fois à la flexibilité de la tétramérisation au niveau du domaine « *coiled-coil* » mais aussi aux résidus situés entre le domaine « *coiled-coil* » et le domaine RHH qui ont la capacité de se tordre, ce qui fait que l'angle entre les domaines « *coiled-coil* » et les domaines RHH peut varier au sein d'un dimère (Dupaigne et al., 2012).

La tétramérisation de MatP permet le rapprochement de deux sites *matS* distants. Lorsque les deux sites *matS* sont sur la même molécule d'ADN, cela conduit à la formation de boucle, que l'on peut visualiser en AFM ainsi qu'en microscopie électronique (Figure 37C).

3.1.3. Le rôle de MatP dans l'organisation et la dynamique du MacroDomaine Ter

3.1.3.1. Condensation et mobilité du MacroDomaine Ter

La région terminale du chromosome est ce qu'on appelle un MacroDomaine (voir partie 1.4). Les MacroDomaines ont comme caractéristiques d'être des régions très condensées, au sein desquelles les loci présentent une faible mobilité, et qui sont isolées les unes des autres, et où les contacts entre loci appartenant à deux MacroDomaines différents sont très peu fréquents. La protéine MatP est impliquée dans la condensation de la région *ter*, dans la restriction de la mobilité des loci dans *ter* mais aussi dans l'isolation de la région *ter* vis-à-vis des autres MacroDomaines.

- Isolement de la région *ter*

En absence de MatP, un locus situé dans la région *ter* interagit plus fréquemment avec un locus situé dans un des MacroDomaines voisins (Right ou Left), alors qu'en présence de MatP, la probabilité d'interaction entre deux loci situés dans deux MacroDomaines différents est proche de 0 (Mercier et al., 2008). Par contre, l'absence de MatP ne modifie pas la probabilité d'interaction entre deux loci situés dans un même MacroDomaine autre que *ter*, ainsi que la probabilité d'interaction entre deux loci situés dans deux MacroDomaines différents autre que *ter*. MatP est donc nécessaire à l'isolement de la région *ter* vis-à-vis du reste du chromosome.

- Mobilité des loci dans la région *ter*

Cette perte d'isolation de *ter* en absence de MatP s'accompagne d'une augmentation de la mobilité des loci situés dans cette région. En effet, un locus situé dans *ter* va parcourir en 5

minutes 0,3 μ m en moyenne dans une souche sauvage, et 1,2 μ m en moyenne dans une souche Δ *matP* (Mercier et al., 2008). Un locus dans *ter* est donc environ 4 fois plus mobile en absence de MatP, et est aussi mobile qu'un locus situé dans une des deux régions non structurées (NS-Right et NS-Left). MatP est donc impliqué dans la restriction de mobilité des loci situés dans la région *ter*.

- Condensation de la région *ter*

Pour finir, l'inactivation de MatP affecte la condensation de la région *ter*. La condensation d'une région du chromosome peut être évaluée en mesurant la distance interfocale moyenne entre deux loci chromosomiques. En absence de MatP, la distance interfocale entre deux loci distants de 100 Kb est multipliée par 2 (0,13 μ m dans une souche sauvage contre 0,27 μ m dans une souche Δ *matP*), ce qui indique une diminution de la condensation de *ter*. MatP n'affecte que la condensation de la région *ter* étant donné que les distances interfocales entre loci situés en dehors de *ter* ne sont pas modifiées (Mercier et al., 2008).

Afin de déterminer par quels mécanismes moléculaires MatP condense la région *ter*, différents mutants de MatP ont été testés, notamment le mutant *matP* Δ C20 (délétion complète du domaine « *coiled-coil* » nécessaire à la tétramérisation de MatP) et le mutant *matP* PHI (remplacement des 4 résidus hydrophobes essentiels à la formation du domaine « *coiled-coil* » par 4 glycines). Ces deux mutants sont toujours capables de se fixer au niveau de la région *ter*, ce qui indique que la tétramérisation de MatP n'est pas essentielle à la liaison à l'ADN. Cependant, la région *ter* apparaît moins condensée lorsque MatP est incapable de tétramériser. Cela est confirmé par le fait que la distance interfocale moyenne entre deux loci distants de 100 Kb est de 0,29 μ m pour le mutant *matP* Δ C20 et 0,25 μ m pour le mutant *matP* PHI, soit autant qu'en absence de MatP (Dupaigne et al., 2012). La tétramérisation de MatP serait donc essentielle à la condensation de la région *ter*.

La tétramérisation de MatP est aussi essentielle à la formation de boucles d'ADN (visible en microscopie électronique et en AFM Figure 37C). Cela suggère que la région *ter* d'*E. coli* est condensée grâce à la formation de boucles, entre sites *matS* distants, dépendante de la tétramérisation de MatP.

3.1.3.2. Positionnement intracellulaire de la région *ter*

- Migration de *ter* au centre de la cellule

Dans les cellules nouvellement nées, la région *ter* est située au nouveau pôle de la cellule. Elle migre ensuite au centre de la cellule afin d'y être répliquée. Cette migration se fait de façon séquentielle : les loci situés aux bornes de *ter* migrent avant les loci les plus centraux (Espéli et al., 2012). Cette migration séquentielle se traduit par une disparition progressive du focus MatP-XFP au nouveau pôle de la cellule, et d'une apparition progressive au centre de la cellule. La migration de la région *ter* au centre de la cellule est une étape indépendante de la présence de MatP (Espéli et al., 2012).

En revanche, la migration de la région *ter* au centre de la cellule est dépendante de la réplication. En effet, lorsque la réplication de la région *ter* est retardée, on observe un retard dans la migration au centre de la cellule. Et inversement, lorsqu'il y a réplication précoce de la région *ter*, la relocalisation au centre de la cellule a lieu aussi plus précocement. Le blocage de la réplication entraîne aussi une perte de la localisation de la région *ter* au centre de la cellule (Espéli et al., 2012).

De plus, la migration de *ter* au centre de la cellule coïncide avec la fusion des deux réplisomes au centre de la cellule (que l'on peut visualiser en utilisant une fusion SSB-YPET). Lors de la réplication, les réplisomes s'assemblent au niveau de l'origine de réplication *oriC*, se séparent afin de répliquer les réplichores droits et gauches, puis fusionnent au centre de la cellule au moment de la réplication de *ter* (Reyes-Lamothe et al., 2008).

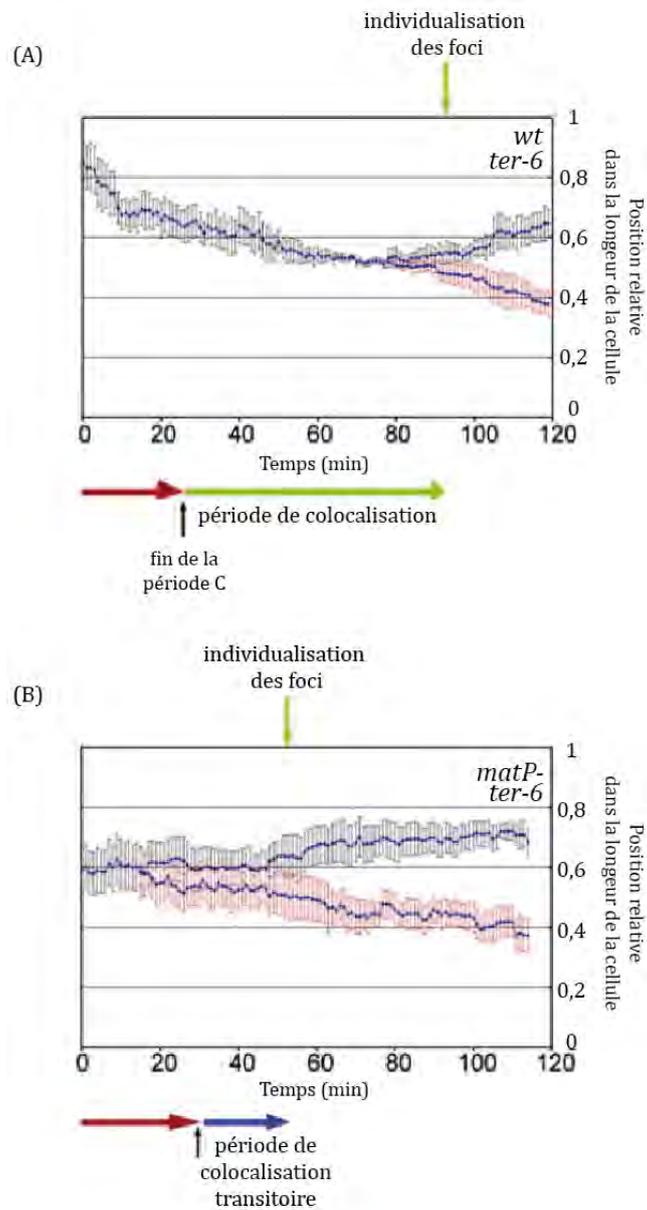


Figure 38 : Profil de ségrégation du locus *ter-6*

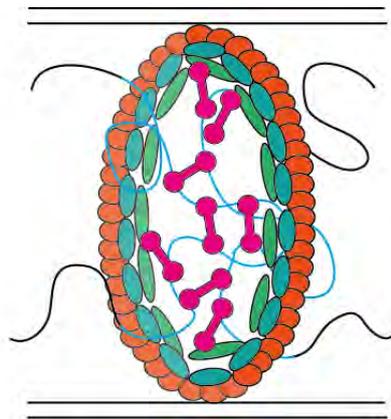
(A) Profil de ségrégation moyen du locus *ter-6* dans une souche sauvage en condition lente de croissance. Après réplication, les loci colocalisent pendant 60 à 70 minutes. Il y a individualisation des loci 20 à 30 minutes avant la division cellulaire. (B) Profil de ségrégation moyen du locus *ter-6* dans un mutant *matP-* en condition lente de croissance. Après réplication, on observe une phase de colocalisation transitoire d'environ 20 minutes. Il y a individualisation précoce des loci 70 minutes avant la division cellulaire. (d'après Mercier *et al.*, 2008)

On a longtemps pensé que la fusion des deux réplisomes au centre de la cellule était la conséquence directe de la rencontre des deux fourches de réplication progressant en orientation inverse sur une molécule circulaire, et avait lieu naturellement au centre de la cellule, compte tenu de la ségrégation progressive des deux chromosomes frères dans les deux futures cellules filles. Cependant, la fusion des deux réplisomes au centre de la cellule est aussi observée lorsque le chromosome d'*E. coli* est linéarisé au niveau du site *dif* (Espéli et al., 2012), suggérant qu'il existe un mécanisme permettant la relocalisation des réplisomes au centre de la cellule et leur fusion.

Tous ces éléments suggèrent que les réplisomes fusionnés, localisés au centre de la cellule, recrutent la région *ter* de manière séquentielle, des extrémités jusqu'au centre, afin de la répliquer. Il y a donc une coordination entre la réplication et la migration de *ter* au centre de la cellule.

- Retard de ségrégation et ancrage au septum de *ter*

Contrairement au reste du chromosome qui est ségrégué au fur et à mesure de sa réplication, les deux régions *ter* nouvellement répliquées au centre de la cellule, restent colocalisées pendant une longue période et ne sont ségréguées dans les deux futures cellules filles que quelques minutes avant la division cellulaire (Adachi et al., 2008; Bates and Kleckner, 2005; Espéli et al., 2008). La période de colocalisation entre les deux régions *ter* varie en fonction du temps de génération. En condition de croissance lente ($\tau=120$ minutes), la migration de la région *ter* au centre de la cellule intervient une vingtaine de minutes après le début du cycle cellulaire, et la ségrégation intervient 20 à 30 minutes avant la division cellulaire, ce qui fait que les deux régions *ter* colocalisent pendant 60 à 70 minutes en moyenne (voir le profil de ségrégation du marqueur *ter-6*, situé à 100 Kb du site *dif* ; Figure 38A) (Mercier et al., 2008). En absence de MatP, la période de colocalisation des deux régions *ter* est fortement perturbée. Juste après la réplication, qui a lieu sensiblement en même temps en absence ou en présence de MatP, on observe une phase transitoire de fusion puis séparation des loci frères de la région *ter*.



Le «Ter Linkage» :
 ADN --> MatP --> ZapB --> ZapA --> FtsZ
 avec *matS*    

Figure 39 : Le «Ter Linkage»

La région terminale du chromosome est maintenue au centre de la cellule via le «Ter Linkage». MatP se lie à l'ADN au niveau des sites *matS* et interagit physiquement avec ZapB. ZapB est recrutée au niveau de l'anneau de FtsZ par l'intermédiaire de ZapA.

Cette phase, qui dure une vingtaine de minutes, est suivie par une ségrégation précoce des deux régions *ter* (70 minutes avant la division cellulaire, contre 20 à 30 minutes en condition sauvage, voir le profil de ségrégation du marqueur *ter-6* ; Figure 38A) (Mercier et al., 2008). L'inactivation de MatP n'as pas de conséquence sur le timing de ségrégation des autres régions du chromosome. Le retard de ségrégation de *ter* est donc fortement dépendant de la présence de MatP.

MatP n'est pas la seule protéine nécessaire au maintien des régions *ter* au centre de la cellule et au retard de ségrégation de celles-ci. En effet, les protéines précoces du divisome FtsZ, ZapA et ZapB sont aussi essentielles à la colocalisation étendue des deux régions *ter* au centre de la cellule. Une expérience en double hybride a permis de mettre en évidence une interaction directe entre ZapB et MatP (Espéli et al., 2012). Cette interaction nécessite la présence de ZapA et de FtsZ. En effet, MatP ne peut interagir avec ZapB que lorsque celle-ci est associée au divisome, et son association au divisome nécessite la présence de ZapA (Figure 39). L'absence de ZapB influence le retard de ségrégation de la région *ter* et l'ancrage au septum de division, mais n'a pas de conséquence sur la condensation de *ter* (Espéli et al., 2012).

L'ancrage de la région Ter au niveau de l'anneau Z nécessite la chaine d'interaction suivante : ADN-MatP-ZapB-ZapA-FtsZ. Cette chaine d'interaction est appelée « *Ter Linkage* » (Männik and Bailey, 2015), et seuls les composants côte à côte dans cette chaine d'interaction interagissent directement ensemble (par exemple MatP interagit de manière directe avec l'ADN et ZapB, mais pas avec ZapA et FtsZ) (Figure 39).

3.1.3.3. *Cohésion post-réplivative des loci dans Ter*

Le rôle de MatP dans la condensation de la région *ter*, la mobilité des foci dans *ter* ainsi que l'ancrage au septum via l'interaction avec ZapB est bien décrit dans la littérature. Une étude récente montre que MatP influence aussi la cohésion post-réplivative de la région *ter*, ainsi que la cohésion post-réplivative du reste du chromosome, en coordonnant l'activité de MukB et de la TopoIV.

Nous avons vu précédemment que la cohésion post-réplivative derrière les fourches de réplification est principalement due à l'accumulation de précaténanes, et que la résolution de ces précaténanes est dépendante de la TopoIV (voir partie 2.5.1). En effet, l'inactivation partielle de la TopoIV augmente la cohésion post-réplivative d'un facteur deux, et inversement une surexpression de la TopoIV induit une diminution de la cohésion post-réplivative (Lesterlin et al., 2012). De plus, l'activité de la TopoVI est elle-même régulée négativement par SeqA (qui inhiberait indirectement l'activité de la TopoIV juste après le passage des fourches de réplification en séquestrant les précaténanes) et positivement par MukB (qui prendrait la place de SeqA lorsque l'ADN est entièrement méthylé et qui stimulerait l'activité de la TopoIV).

- [Rôle de MatP dans le positionnement du complexe MukBEF](#)

Dans une souche sauvage, MukBEF forme des foci au niveau de l'origine de réplification *oriC*. Il a été proposé que le complexe MukBEF/*oriC* joue un rôle dans la localisation de la région origine avant et après réplification (Badrinarayanan et al., 2012a), ainsi qu'un rôle dans le recrutement de la TopoIV dans cette région du chromosome (Nicolas et al., 2014). Un focus de MukBEF contient en moyenne 8 dimères de dimères de MukBEF et nécessite que les capacités de fixation et d'hydrolyse de l'ATP par MukB soient intactes (Badrinarayanan et al., 2012b).

Dans un mutant MukB^{EQ} (mutant capable de lier de l'ATP, mais dont la capacité d'hydrolyser l'ATP est altérée), le complexe MukB^{EQ}EF forme des foci qui colocalisent avec la région terminale du chromosome, mais ne colocalisent plus avec *oriC* (Nolivos et al., 2016). Le mutant MukB^{EQ} a une activité d'hydrolyse de l'ATP résiduelle (environ 15%). Cette activité résiduelle est nécessaire à la fixation de MukB^{EQ} au niveau de la région *ter*. Cela laisse penser que la fixation et l'hydrolyse de l'ATP par MukB est nécessaire à la formation d'un complexe stable de MukBEF au niveau de l'origine de réplification *oriC*. Par contre, le faible niveau d'hydrolyse de l'ATP d'un mutant MukB^{EQ} est suffisant pour une association du complexe MukB^{EQ}EF avec la région *ter*, mais insuffisant pour la fixation avec *oriC*, qui nécessite des cycles de fixation et d'hydrolyse d'ATP. De plus, une interaction physique directe a été mise en évidence entre le domaine « *hinge* » de MukB et la protéine MatP, fixée sur ses sites *matS* (Nolivos et al., 2016).

Le fait que le complexe MukBEF colocalise uniquement avec la région origine en condition sauvage, et aussi bien avec la région *ter* que la région origine dans une souche $\Delta matP$ (Nolivos et al., 2016) suggère que l'interaction entre MukB et MatP limite l'association du complexe MukBEF avec *ter*. Le fait que MukB^{EQ} interagisse avec la région *ter*, en présence ou en absence de MatP, suggère que MatP ne limite pas l'accessibilité de la région Ter à MukB, mais favorise la dissociation du complexe MukBEF de la région *ter*. Concernant le complexe MukB^{EQ}EF, il n'est pas dissocié de la région *ter* par MatP (Nolivos et al., 2016). Cela peut s'expliquer par le fait que son activité d'hydrolyse de l'ATP est réduite et/ou par des différences architecturales entre les complexes MukBEF et MukB^{EQ}EF. On ne sait pas à l'heure actuelle quels sont les mécanismes moléculaires favorisant les interactions préférentielles entre le complexe MukBEF et les régions origines et terminales du chromosome.

- [Rôle de MatP dans la régulation de l'activité de la TopoIV](#)

L'interaction de MukB avec la sous-unité ParC de la TopoIV n'est pas dépendante de la localisation de MukB. En effet, MukB colocalise toujours avec ParC, en présence ou en absence de MatP (Nolivos et al., 2016). Cela signifie donc que MatP, en favorisant la dissociation de MukB de la région *ter* et de ce fait en favorisant l'association de MukB avec l'origine de réplication *oriC*, régule le positionnement de la sous-unité ParC de la TopoIV.

Afin de savoir quelle était l'influence de MatP et de MukB sur la décaténation de la région *ter* médiée par la TopoIV, la durée de la cohésion post-réplivative a été mesurée à différents loci et dans différents contextes génétiques. En absence de MatP, la région *ter* est ségrégée plus précocement que dans une souche sauvage (Mercier et al., 2008). Pour savoir si cette ségrégation précoce est une conséquence directe de la stimulation de la décaténation de la région Ter par l'interaction de MukB avec la sous-unité ParC de la TopoIV, la cohésion post-réplivative a été mesurée dans une souche $\Delta mukB$ ainsi que dans une souche où l'interaction MukB-ParC est détériorée par une surexpression du domaine C-terminal de ParC, impliqué dans l'interaction ParC-MukB.

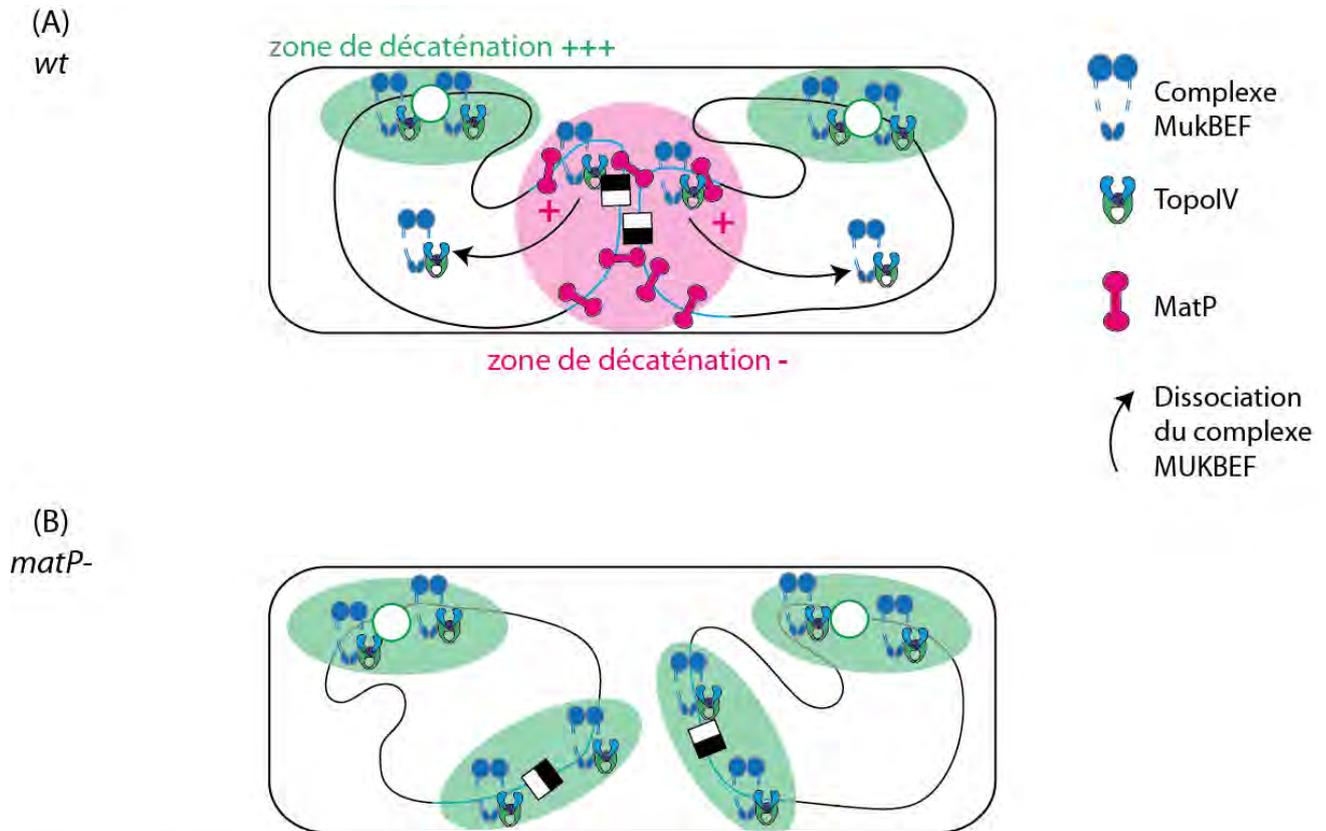


Figure 40 : Régulation de l'activité de la TopoIV par MatP et MukB

(A) Dans une souche sauvage, les complexes MukBEF s'associent au niveau des régions origines et terminales du chromosome. La formation d'un complexe stable nécessite l'hydrolyse d'ATP par MukB. Une interactions physique entre le domaine «hinge» de MukB et la protéine MatP provoque la dissociation du complexe MukBEF de la région terminale. Le complexe MukBEF est associé à la TopoIV et favorise l'activité de décaténation au niveau des régions origines. (B) En absence de MatP, les complexes MukBEF s'associent au niveau des régions origines et terminales, et il n'y a pas de dissociation par MatP au niveau de la région terminale. Le complexe MukBEF associé à la TopoIV favorise l'activité de décaténation au niveau de la région origine mais aussi au niveau de la région terminale, ce qui provoque une ségrégation précoce des deux régions terminales après réplication. (D'après Nolivos *et al.*, 2016)

Dans la souche $\Delta mukB$, que ce soit en présence ou en absence de MatP, on observe une forte augmentation de la période de cohésion post-réplivative (Nolivos et al., 2016), ce qui indique que la ségrégation précoce observée dans une souche $\Delta matP$ est dépendante de la présence du complexe MukBEF.

Lorsque l'interaction MukB-ParC est détériorée, la période de cohésion post-réplivative de la région *ter* n'est pas modifiée, sauf en absence de MatP (Nolivos et al., 2016), ce qui indique que la ségrégation précoce dans une souche $\Delta matP$ est dépendante du recrutement de la TopoIV par le complexe MukBEF au niveau de la région *ter*, et donc dépendante d'une décaténation précoce des deux chromosomes frères par la TopoIV. Le fait que l'allongement de la cohésion post-réplivative en absence de MatP soit plus important dans un mutant $\Delta mukB$ que dans un mutant où l'interaction MukB-ParC est détériorée (Nolivos et al., 2016) laisse penser que MukB, en plus de réguler l'activité de décaténation de la TopoIV au niveau de la région *ter*, joue d'autres rôles dans la ségrégation, indépendamment de la TopoIV.

- [Modèle de régulation de l'activité de la TopoIV par MatP et MukB](#)

Le modèle proposé à l'heure actuelle est que le complexe MukBEF peut se fixer à différents endroits du chromosome, avec une préférence pour la région *ter*. Cette association au chromosome nécessite l'hydrolyse d'une molécule d'ATP. Au niveau de la région *ter*, MatP est fixée aux sites *mats*. Une interaction directe entre MatP et le domaine « *hinge* » de MukB provoque la dissociation de MukB de la région terminale du chromosome, favorisant ainsi l'association du complexe MukBEF au niveau de l'origine de réplification *oriC*. La dissociation ainsi que la relocalisation au niveau d'*oriC* nécessite aussi l'hydrolyse de l'ATP (Figure 40).

Comme MukB interagit de manière directe avec la sous-unité ParC de la TopoIV, et favorise l'activité de décaténation de la TopoIV, la dissociation de MukB de la région *ter* par MatP permettrait de restreindre l'activité de décaténation de cette région, et donc d'augmenter sa durée de cohésion post-réplivative. A l'inverse, cela favoriserait l'activité de décaténation de la TopoIV au niveau de l'origine de réplification et ainsi favoriserait la séparation des origines (Figure 40).

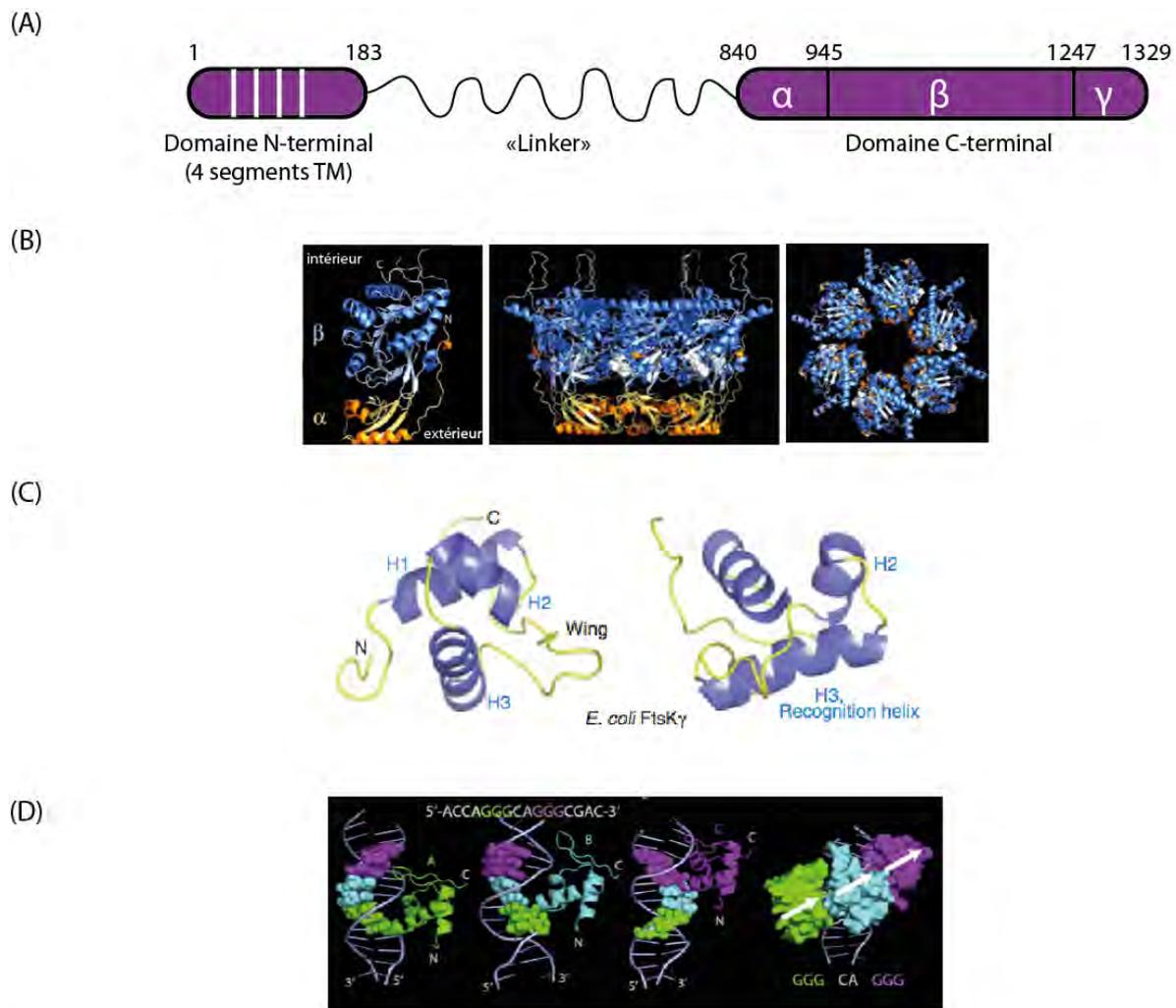


Figure 41 : Structure de FtsK

(A) FtsK est composée d'un domaine N-terminal essentiel, faisant partie du divisome, et d'un domaine C-terminal, impliqué dans la ségrégation de la région terminale du chromosome et la résolution des dimères de chromosome. Le domaine C-terminal est subdivisé en 3 sous-domaines : α , β et γ . (B) A gauche, structure cristallographique des sous-domaines α et β de FtsK. L'orientation est donnée par rapport à la structure hexamérique. Au milieu et à droite, structure de l'hexamère de FtsK $\Delta\alpha\Delta\gamma$ de *P. aeruginosa* vue de côté et de dessus. Les 6 sous-unités forment un anneau de 120Å de diamètre extérieur, avec un canal intérieur de 30Å. (D'après Massey *et al.*, 2006) (C) Structure du sous-domaine γ de FtsK d'*E. coli* résolue par RMN. Le sous-domaine γ est composé de trois hélices (H1, H2 et H3) et d'une aile (Wing) en C-terminal. (D'après Sivanathan *et al.*, 2006) (D) Structure du co-cristal de FtsK $\Delta\alpha\Delta\gamma$ de *P. aeruginosa* avec un ADN contenant un motif KOPS. Trois sous-domaines γ reconnaissent un KOPS. Les sous-domaines en violet et vert reconnaissent chacun un triplet «GGG» et le sous-domaine en bleu reconnaît le dinucléotide central CA. Les trois sous-domaines sont orientés dans le même sens (flèches blanches sur la figure de droite). (D'après Löwe *et al.*, 2008)

MatP et MukB joueraient donc un rôle central dans la coordination des étapes précoces et tardives de la ségrégation des chromosomes et veilleraient au maintien d'une période de cohésion post-réplivative plus longue au niveau de la région terminale du chromosome. Cette cohésion post-réplivative étendue serait nécessaire à la coordination entre les dernières étapes de la ségrégation et la division cellulaire comme nous allons le voir dans la partie suivante.

3.2. FtsK : La protéine de couplage de la ségrégation et de la division

3.2.1. Présentation de FtsK

FtsK est une protéine multifonctionnelle de 1329 acides aminés. Elle est constituée de trois domaines : un domaine N-terminal (183 aa), composé de 4 segments transmembranaires et impliqué dans la formation du septum de divisome, un domaine C-terminal (490 aa), impliqué dans la ségrégation de la région *ter* et la résolution des dimères de chromosome, et un long linker (656 aa) (Figure 41A).

3.2.2. Le domaine C-terminal de FtsK

3.2.2.1. Structure et fonction

Le domaine C-terminal de FtsK appartient à la famille des translocases à ADN double brin FtsK/SpoIIIE/Tra. Les translocases à ADN ont la capacité de se déplacer sur les molécules d'ADN grâce à l'hydrolyse de molécules d'ATP. Les translocases de la famille FtsK/SpoIIIE/Tra ont la particularité d'être fixées à la membrane, elles jouent donc le rôle de pompe à ADN, en tirant sur les molécules d'ADN lorsqu'elles sont en cours de translocation.

Le domaine C-terminal de FtsK est subdivisé en 3 sous-domaines : α , β et γ . Les sous-domaines α et β hexamérisent pour former un anneau autour de l'ADN (Figure 41B) (Massey et al., 2006). Ces deux sous-domaines forment le moteur de la translocation. Le sous-domaine β possède les sites de liaison (Walker A) et d'hydrolyse (Walker B) de l'ATP.

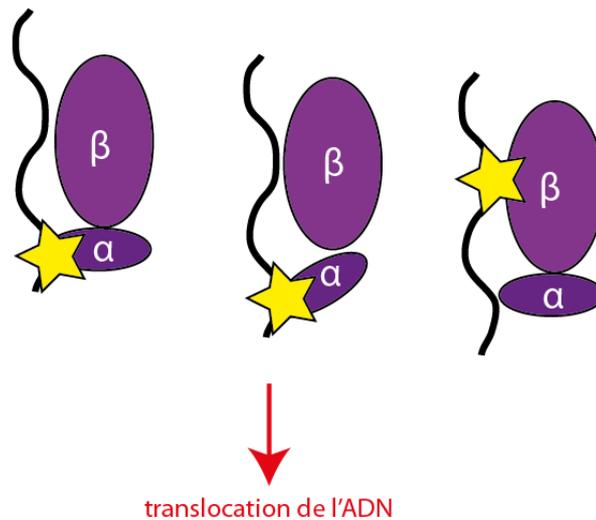


Figure 42 : Modèle de translocation de l'ADN par les sous-domaines α et β de FtsK

A gauche, le sous-domaine α contact l'ADN (étoile jaune). Les deux-sous-domaines sont dans une conformation rapprochée. Au milieu, la fixation, l'hydrolyse d'ATP et la libération d'ADP entraîne un changement de conformation des deux sous-unités. Ce changement de conformation éloigne les deux sous-domaines, et entraîne une translocation d'1,6 pb. A droite, L'ADN n'est plus lié par la sous-unité α mais par la sous-unité β . (D'après Massey *et al.*, 2006)

Les motifs Walker A et Walker B sont les signatures caractéristiques des ATPase de type AAA+ (Walker et al., 1982). Ces deux sous-domaines permettent la translocation de l'ADN, nécessaire à la ségrégation de la région *ter* du chromosome (voir partie 3.2.3).

La structure du sous-domaine γ de FtsK n'a pas pu être obtenue en cristallographie en même temps que les sous-domaines α et β car il est séparé du moteur hexamérique par un court linker flexible. Cependant, les structures des sous-domaines γ d'*E. coli* et de *Pseudomonas aeruginosa* ont été résolues par RMN (Sivanathan et al., 2006). Le sous-domaine γ possède un domaine de liaison à l'ADN de type « *winged-helix* » (Figure 41C) constitué de 3 hélices (H1, H2 et H3), de 2 feuillets (S1 et S3) et d'une « aile » en C-terminal (W). Généralement, les domaines « *winged-helix* » interagissent avec l'ADN grâce à un contact de l'hélice H3 au niveau du sillon majeur et de l'aile W au niveau du sillon majeur (Gajiwala and Burley, 2000). Ce sous-domaine a deux fonctions majeures dans la ségrégation des chromosomes : il permet d'orienter la translocation grâce à la reconnaissance des KOPS (voir partie 3.2.2.3) et il permet aussi d'activer la recombinaison spécifique de site XerCD au site *dif*, nécessaire à la résolution des dimères de chromosome (voir partie 3.2.4.3).

3.2.2.2. *Translocation de l'ADN pour les sous-domaines α et β*

In vitro, il a été montré que FtsK était capable de transloquer à une vitesse comprise entre 5 et 7 Kb par seconde, ce qui fait de FtsK la translocase à ADN la plus rapide caractérisée à ce jour (Saleh et al., 2004). L'hydrolyse de l'ATP ainsi que le relargage de l'ADP semble entraîner un changement de conformation des deux sous-unités α et β . C'est ce changement de conformation qui pourrait être à l'origine de la translocation de l'ADN. Deux modèles ont été proposés pour expliquer la translocation de l'hexamère sur l'ADN. Les deux modèles sont basés sur le changement de conformation des sous-domaines α et β permettant la translocation (Figure 42):

- Les sous-domaines α et β sont dans une conformation rapprochée
- Le sous-domaine α contacte l'ADN

- La fixation, l'hydrolyse de l'ATP et le relargage de l'ADP entraîne un changement de conformation des sous-domaines α et β
- Ce changement de conformation éloigne les deux sous-domaines et entraîne une translocation de l'ADN de 1,6pb
- Seul le sous-domaine β est maintenant en contact avec l'ADN

Les deux modèles diffèrent concernant le rôle de chaque monomère dans la translocation. Dans le modèle « rotary inchworm », à la fin du cycle décrit ci-dessus, le monomère adjacent contacte l'ADN via son sous-domaine α et un nouveau cycle de translocation reprend. L'hydrolyse de l'ATP et donc la translocation se font de façon séquentiel, monomère par monomère (Massey et al., 2006). Ce modèle n'est pas compatible avec le fait que la vitesse de translocation n'est pas modifiée lorsque deux sous-unités de l'hexamères sont déficientes en activité ATPase (Croizat et al., 2010). C'est pourquoi un autre modèle, appelé « staircase » a été proposé (Croizat and Grainge, 2010). Dans ce modèle, l'hexamère est positionné sur l'ADN dans une configuration en escalier spiralé, ce qui permet à chaque monomère de contacter la molécule d'ADN. Les étapes de fixation, d'hydrolyse de l'ATP et de relargage de l'ADP s'effectuent en même temps sur chaque monomère, et donc tous les monomères transloquent du même nombre de paires de bases en même temps.

3.2.2.3. *Orientation de la translocation par le sous-domaine γ*

La translocation de FtsK est orientée grâce à la reconnaissance des KOPS. Les KOPS sont des motifs de 8 pb (GGGNAGGG, voir partie 1.2.2.2) dont l'orientation est biaisée sur le chromosome. Les KOPS sont presque tous orientés de l'origine de réplication *oriC* vers le site *dif*, et de ce fait, orientent la translocation de FtsK en direction du site *dif* (Levy et al., 2005).

L'obtention du co-cristal du sous-domaine γ de FtsK de *P. aeruginosa* avec un fragment d'ADN de 16 pb contenant un motif KOPS (GGGCAGGG) (Figure 41D) a permis de mettre en évidence un contact entre l'hélice H3 et le sillon majeur et entre l'« aile » W et le sillon mineur au niveau du motif KOPS.

De plus, cette étude a aussi permis de mettre en évidence qu'un seul motif KOPS était reconnu par 3 sous-domaines γ : 2 sous-domaines reconnaissent les 2 répétitions GGG et 1 sous-domaine reconnaît le dinucléotide central (Figure 41D) (Löwe et al., 2008).

Trois modèles ont été proposés pour expliquer le rôle des KOPS dans l'orientation de la translocation :

- FtsK serait capable de se charger sur n'importe quelle molécule d'ADN et de commencer à transloquer. Lors de la translocation, FtsK reconnaît les KOPS placés en orientation non permissive, ce qui la stoppe, et entraîne soit un changement de direction, soit une dissociation de l'ADN. Ce modèle est compatible avec les études montrant que FtsK est capable de se charger sur n'importe quel ADN, possédant ou non des KOPS (Aussel et al., 2002; Levy et al., 2005; Pease et al., 2005).
- Les KOPS seraient des sites préférentiels de chargement de FtsK, ce qui permet d'orienter la translocation de FtsK dès son chargement dans la direction *oriC* vers *dif*. En cours de translocation, FtsK ne reconnaît plus les KOPS. Ce modèle est compatible avec les expériences de molécules uniques montrant que FtsK s'assemble sous forme d'hexamères actif uniquement lorsqu'il y a un motif KOPS en orientation permissive et que FtsK ne reconnaît plus les KOPS en orientation non-permissive en cours de translocation (Bigot et al., 2006; Graham et al., 2010; Löwe et al., 2008). De plus, ce modèle est plus favorable énergétiquement que le premier, puisqu'il évite qu'il y est une perte d'énergie due au chargement d'un hexamère actif sur l'ADN qui va ensuite être dissocié lors de la rencontre d'un KOPS en orientation non permissive, ou d'un autre hexamère transloquant dans la direction inverse.
- FtsK se chargerait sur n'importe quel ADN, de manière non spécifique, puis il y aurait activation de la translocation uniquement au niveau des KOPS. Ce modèle est basé sur l'étude de l'orientation de la translocation de SpoIIIE, qui appartient à la même famille des translocases à ADN que FtsK, et participe au transport d'une copie du chromosome dans la pré-spore chez *B. subtilis* (Cattoni et al., 2013).

-

3.2.2.4. Restriction de l'activité de translocation de FtsK à la FHAR

Comme FtsK est localisée au septum de division à la fin du cycle cellulaire, et qu'à ce moment-là du cycle, seule la région terminale du chromosome est encore localisée au centre de la cellule via les interactions MatP-ZapB, la question s'est posée de savoir si FtsK était active en translocation sur la totalité du chromosome, ou bien uniquement sur une région précise. Pour cela, la fréquence d'excision d'une cassette *dif-lacI-dif* a été mesurée à différentes positions chromosomiques. Comme la recombinaison spécifique de site XerCD entre les deux sites *dif* est dépendante de la présence du sous-domaine γ de FtsK, la fréquence de recombinaison est dépendante de la probabilité de présence de FtsK dans la région d'insertion de la cassette. L'utilisation de ce système a permis de mettre en évidence que l'activité de FtsK est restreinte à une zone d'environ 350 Kb centrée sur le site *dif*. Cette zone est appelée FHAR pour FtsK High Activity Region.

La capacité de translocation de FtsK est nécessaire à la restriction de l'activité de FtsK à la FHAR. En revanche, la reconnaissance des KOPS par le sous-domaine γ , et donc l'orientation de la translocation, ne sont pas requis (Deghorain et al., 2011). Il est à noter que la FHAR ne correspond pas à la totalité de la région *ter*, mais à une région plus petite au centre de la région *ter*.

3.2.3. FtsK et la ségrégation de la région *ter*

Bien que la région *ter* présente une cohésion post-répllicative plus longue que le reste du chromosome et n'est ségrégée qu'à la fin du cycle cellulaire, elle présente une ségrégation orientée et progressive, comme le reste du chromosome. C'est-à-dire que les loci aux bornes de la région *ter* sont ségrégés avant les loci situés dans la FHAR. Le dernier locus à être ségrégé est le site *dif* (Stouf et al., 2013).

L'analyse de l'ordre de ségrégation de loci situés hors de la FHAR et de loci situés dans la FHAR, y compris le site *dif*, dans différents contextes génétiques a permis de mettre en évidence le rôle essentiel de FtsK dans la ségrégation des loci situés dans la FHAR uniquement.

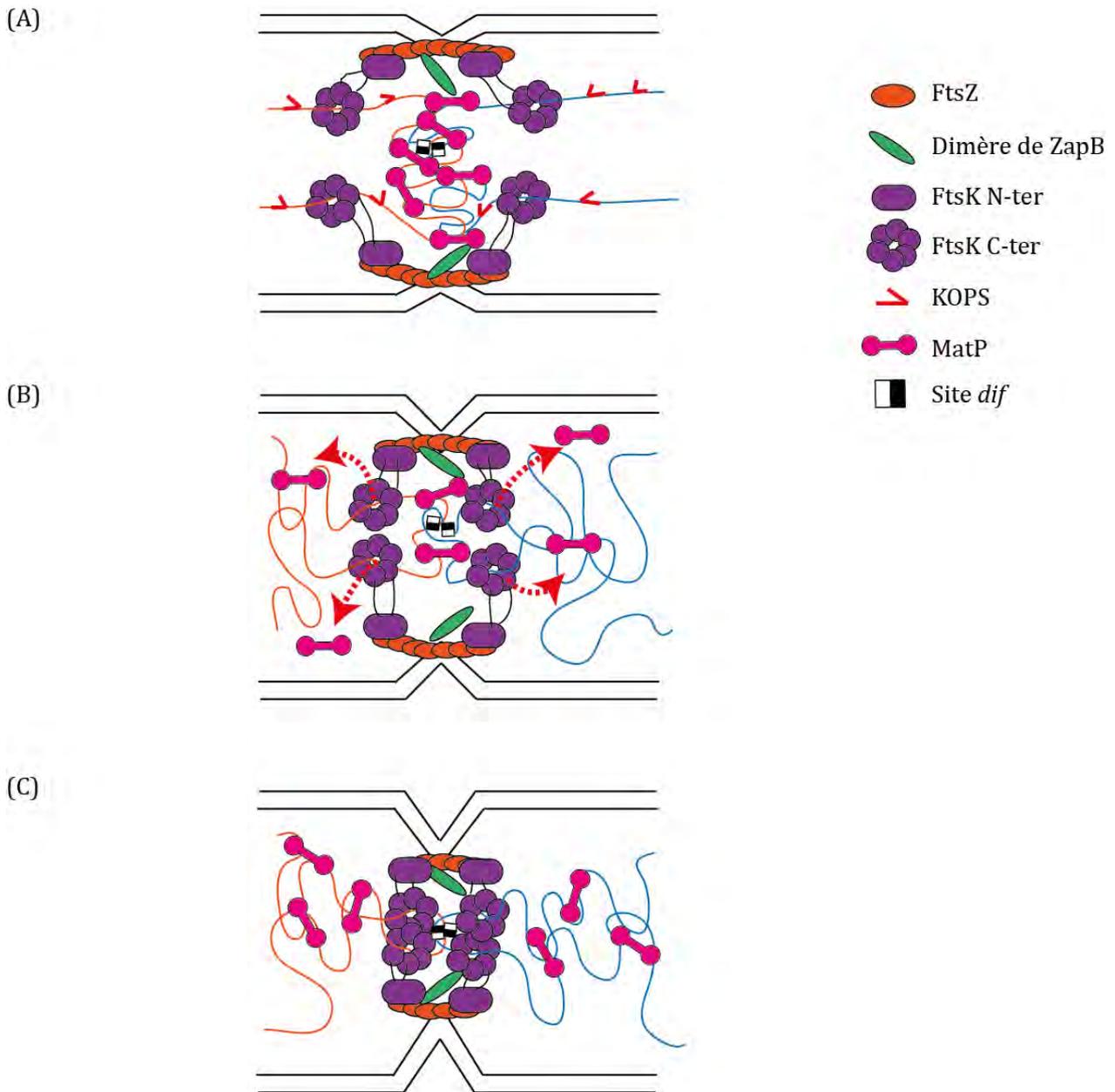


Figure 43 : Modèle de ségrégation de la région *ter* par FtsK

(A) A la fin du cycle cellulaire, la région *ter* est maintenue au centre de la cellule, à proximité du divisome grâce au «Ter Linkage» (interaction ADN-MatP-ZapB-ZapB-FtsZ). Elle est compactée grâce aux interactions MatP-MatP. Le pontage entre deux sites *matS* distants peut se faire en inter ou en intra-moléculaire. FtsK, qui est recrutée au septum juste après la stabilisation de l'anneau Z par les protéines Zap, se charge préférentiellement en périphérie de la région *ter* et transloque l'ADN en direction des sites *dif* grâce à la reconnaissance des motifs KOPS. par le sous-domaine γ . (B) FtsK, par son activité de translocation orientée, nettoie l'ADN de toutes les protéines interagissant avec, notamment MatP. La translocation enlève donc progressivement les interactions MatP-MatP et MatP-ZapB, permettant ainsi la ségrégation orientée et progressive de la région *ter*. (C) Après le passage de FtsK, MatP vient de nouveau se fixer aux sites *matS*, créant des pontages entre deux sites *matS* distants, mais appartenant, cette fois-ci, à la même molécule d'ADN.

Pour que la ségrégation de la FHAR se fasse de manière ordonnée et progressive, il faut que (i) FtsK soit capable de transloquer l'ADN et que (ii) la translocation soit orientée en direction du site *dif* grâce à la reconnaissance des KOPS (Stouf et al., 2013). De plus, la présence de MatP est essentielle à la ségrégation ordonnée et progressive de la FHAR par FtsK. En effet, l'absence de MatP modifie l'ordre de ségrégation des loci situés dans la FHAR, mais pas l'ordre de ségrégation des loci situés dans la région *ter* mais en dehors de la FHAR (Stouf et al., 2013). Il est intéressant de noter que MatP, bien que présente sur la totalité de la *ter*, n'influence que la ségrégation de la région FHAR. A l'heure actuelle, la seule piste pour expliquer cette différence entre la FHAR et le reste de la région *ter* est que la densité de sites *matS* est plus importante dans la FHAR que dans le reste du chromosome, et donc que le rôle de MatP serait plus important dans cette région.

Le modèle proposé pour expliquer le rôle de MatP et de la translocation orientée de FtsK dans la ségrégation ordonnée, précise et progressive de la FHAR est basé sur la capacité de FtsK à nettoyer l'ADN lorsqu'elle est en cours de translocation. Ce modèle dit « en double zip » est le suivant (Figure 43) :

- A la fin de la réplication de la région terminale du chromosome, les deux régions *ter* nouvellement répliquées sont maintenues au centre de la cellule grâce aux interactions MatP-ZapB et sont maintenues dans un état de cohésion et de compaction important grâce aux interactions MatP-MatP entre 2 sites *matS* sur deux chromosomes différents ou entre 2 sites *matS* sur le même chromosome respectivement.
- La plus forte concentration de sites *matS* autour du site *dif* (région FHAR) crée un noyau plus compacte autour du site *dif*, ce qui rendrait le site *dif* moins accessible.
- Lorsque FtsK est recrutée au septum de division, peu de temps après la formation de l'anneau Z et sa stabilisation, par ZapB notamment, FtsK va se charger en périphérie de la FHAR, et grâce à la reconnaissance des KOPS par le sous-domaine γ , va transloquer l'ADN en direction du site *dif*.

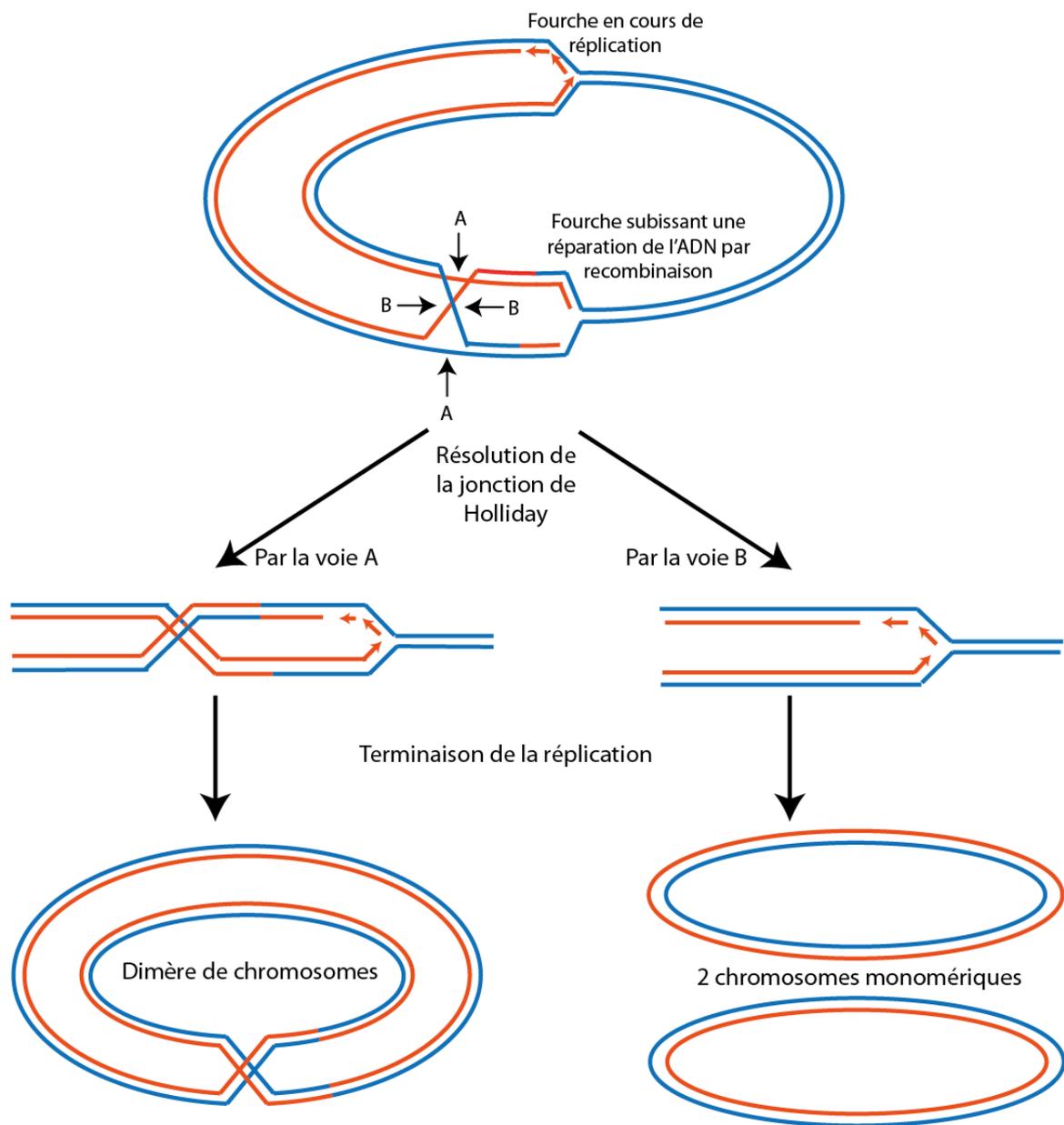


Figure 44 : Formation des dimères de chromosomes

Les cassures de l'ADN situées en amont des fourches de réplication peuvent être réparées par recombinaison homologue. Cette réparation fait intervenir un intermédiaire de réaction, une jonction de Holliday, qui peut être résolue dans deux orientations différentes (flèches A et B). La résolution de la jonction par la voie A conduit à un crossing-over entre les deux chromatides. Un nombre impair de crossing-over entre les deux chromatides soeurs conduit à la formation d'un dimère de chromosomes. (D'après Cox *et al.*, 2000)

- Cette translocation de l'ADN par FtsK en direction du site *dif* va chasser progressivement MatP des sites *matS*. Cela va avoir pour conséquence un relâchement progressif de la cohésion et de la compaction des deux régions *ter* dues aux interactions MatP-MatP ainsi qu'un relâchement progressif de l'attachement au septum de division des loci due aux interactions MatP-ZapB, jusqu'au dernier point de contact entre les deux chromosomes : le site *dif*.

Lorsque les régions terminales nouvellement répliquées sont ségréguées par FtsK, qui chasse MatP, deux types de liens peuvent encore persister et empêcher la ségrégation totale des deux chromosomes frères, et donc la bonne répartition du matériel génétique dans les deux futures cellules filles : les liens d'intercaténations ainsi que les dimères de chromosomes. Nous verrons dans la partie suivante que FtsK joue un rôle important dans la résolution de ces deux types de liens.

3.2.4. FtsK et la résolution des dimères de chromosomes

3.2.4.1. Formation des dimères de chromosome

Au cours de la réplication, les cassures de l'ADN peuvent être réparées par recombinaison homologues entre les deux chromatides sœurs nouvellement répliquées. La réparation par recombinaison homologue fait intervenir un intermédiaire de réaction : une jonction de Holliday. La résolution de cette jonction de Holliday par le complexe RuvABC peut se faire dans les deux orientations différentes : l'une conduisant à un crossing-over entre les deux chromatides et l'autre non (Figure 44) (Cox et al., 2000). Les deux molécules d'ADN étant circulaires, un nombre impair de crossing-over lie les deux molécules de manière covalente en une seule molécule unique que l'on appelle dimère de chromosome. En une génération, on estime qu'il y a environ 15% des cellules avec un dimère de chromosome. Ce chiffre, plus faible que celui attendu si la résolution de la jonction se faisait de manière aléatoire, s'explique par le fait que la voie de résolution par RuvABC est biaisée et conduit plus souvent à la résolution de la jonction sans crossing-over plutôt qu'avec crossing-over (Michel et al., 2000).

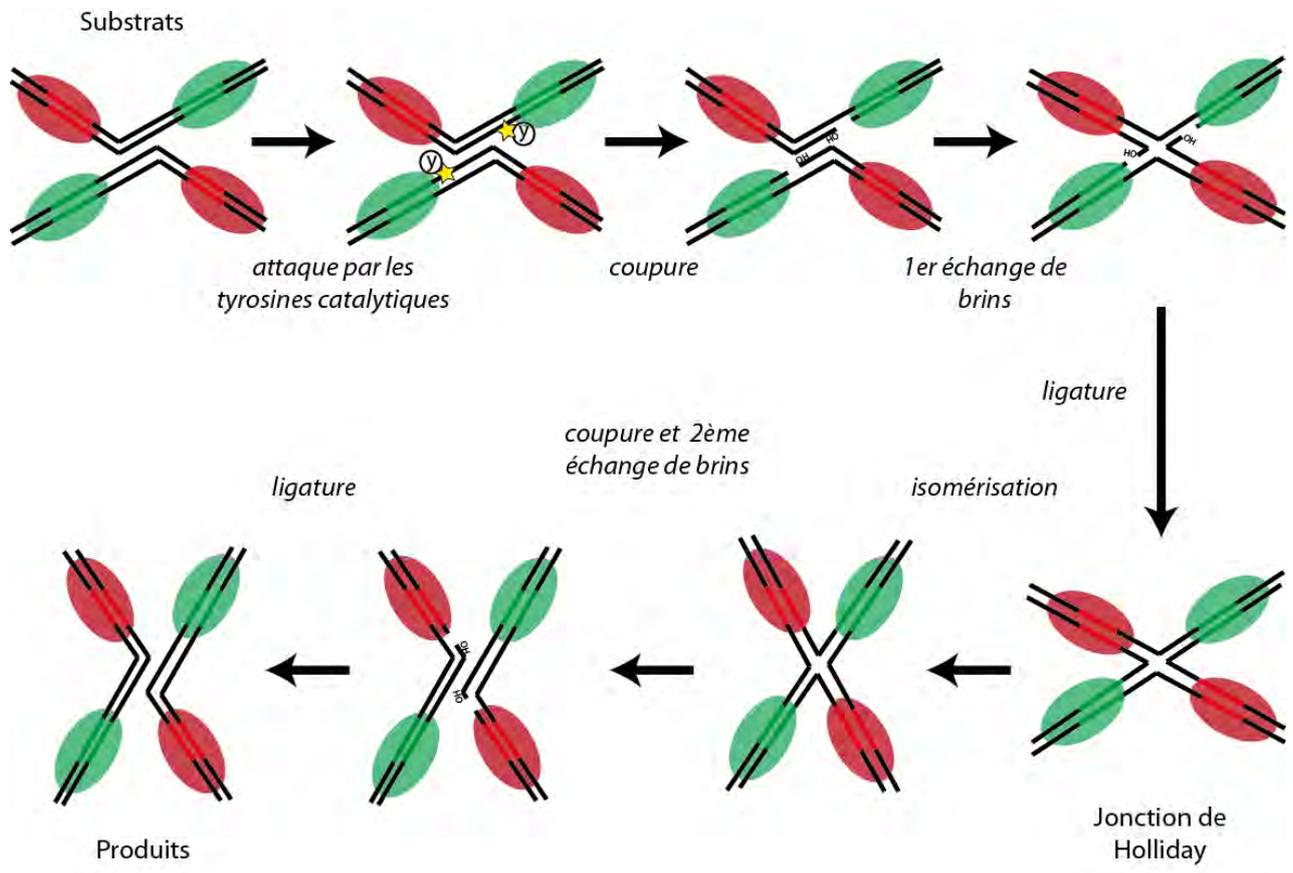


Figure 45 : Mécanisme de recombinaison spécifique de site XerCD à dif

Le complexe synaptique comprend deux ADN substrats portant un site dif, et quatre monomères de recombinases Xer (2 XerC et 2 XerD). Une première coupure est catalysée par les tyrosines catalytiques de deux monomères diamétralement opposés. Le groupement 5'OH libéré va attaquer le groupement 3'-phosphotyrosyl du brin complémentaire. Il y a un premier échange de brins. Après ligature, il y a formation d'une jonction de Holliday. Après isomérisation, la jonction de Holliday va être résolue par le deuxième couple de recombinases.

3.2.4.2. *La recombinaison spécifique de site XerCD/dif*

Afin de résoudre les dimères de chromosome, dus à un nombre impair de crossing-over, il suffit qu'il y ait de nouveau un crossing-over entre les deux chromatides. Chez *E. coli*, il existe un système de recombinaison spécifique de site XerCD, qui agit au niveau du site *dif*, et catalyse une réaction d'échange de brin entre les deux chromatides.

La recombinaison XerCD/*dif* fait intervenir deux recombinases à tyrosine de 298 aa chacune : XerC et XerD ainsi qu'un site de recombinaison de 28 pb : le site *dif* (voir partie 1.2.1). Le site *dif* possède deux bras de fixation de 11 pb pour XerC et XerD et une région centrale de 6 pb où a lieu la réaction d'échange de brins. La réaction de recombinaison nécessite 4 monomères de recombinases (2 monomères XerC et 2 monomères XerD) et 2 sites *dif*, qui s'assemblent en un complexe appelé synapse de recombinaison. Dans cette synapse, une première coupure va être catalysée par les tyrosines catalytiques de 2 monomères diamétralement opposés. Le groupement 5'-hydroxyl ainsi libéré va attaquer le groupement 3'-phosphotyrosyl du brin complémentaire, conduisant à un premier échange de brins et donc à la formation, après ligation, d'une jonction de Holliday. Après isomérisation, la jonction de Holliday va être résolue par le deuxième couple de recombinases, suivant le même mécanisme (coupure puis échange de brins) (Figure 45) (Blakely et al., 2000; 1997; Blakely and Sherratt, 1994).

3.2.4.3. *Rôle de FtsK dans l'activation de la recombinaison XerCD/dif*

FtsK joue un rôle essentiel dans l'activation de la recombinaison XerCD à *dif*, nécessaire à la résolution des dimères de chromosome. En effet, en absence de FtsK, le premier couple de recombinases actifs est généralement le couple de recombinases XerC, qui catalyse le premier échange de brins et permet la formation de la jonction de Holliday. Cependant cette jonction est abortive, et ne peut être résolue par le couple de recombinases XerD. Il y a donc un retour en arrière, la jonction de Holliday formée est reconvertie en substrat par le couple XerC, et aucun crossing-over additionnel n'a lieu entre les deux chromatides sœurs.

A l'inverse, en présence de FtsK, le premier couple actif est le couple de recombinaisons XerD. La jonction de Holliday ainsi formée peut être résolue par le second couple de recombinaisons XerC, indépendamment de FtsK (Aussel et al., 2002; Massey et al., 2004). Cela conduit à un crossing-over additionnel entre les deux chromatides sœurs et permet de résoudre le dimère en deux monomères indépendants pouvant être ségrégués dans les deux futures cellules filles. L'activation de la recombinaison par FtsK est due à un contact direct du sous-domaine γ et les recombinaisons XerD. Ce contact modifie la conformation de la synapse de recombinaison et favorise le premier échange de brin catalysé par XerD et non XerC (Massey et al., 2004). FtsK permet aussi d'augmenter le taux de formation de synapses (Diagne et al., 2014).

3.2.5. FtsK et la décaténation des chromosomes

Le rôle de FtsK et de la recombinaison XerCD/*dif* dans le contrôle de l'activité de décaténation de la TopoIV est suspecté depuis longtemps mais reste encore assez évasif. Nous avons vu précédemment que la TopoIV était impliquée dans la résolution des précaténanes, qui s'accumulent derrière les fourches de réplication et sont responsables du maintien de la cohésion post-répllicative (voir partie 2.5.1).

Mais surtout, la TopoIV semble principalement requise pendant la période D (entre la fin de la réplication et la division cellulaire) pour résoudre les liens d'intercaténation. En effet, dans une population de cellules synchronisées, la majorité de l'activité de la TopoIV est restreinte à la fin du cycle cellulaire, à un endroit précis, correspondant à la localisation de la région *ter* (Espéli et al., 2003b). Cela suppose que les précaténanes ne sont pas tous résolus au cours de la réplication, et persistent donc sous forme de liens d'intercaténation entre les deux chromosomes frères à la fin de la réplication, au niveau de la région *ter*.

Malgré les divergences retrouvées dans la littérature, il semble évident que la TopoIV, FtsK et la recombinaison XerCD/*dif* sont étroitement liées dans le temps et dans l'espace, afin de permettre la résolution des liens d'intercaténation et d'assurer la ségrégation correcte des deux chromosomes frères, à la fin du cycle cellulaire. En effet, *in vivo*, il a été mis en évidence que le site *dif* est un site de clivage préférentiel pour la TopoIV, et que la coupure à *dif* par la

TopoIV nécessite la présence des recombinases XerC et XerD, mais pas la présence du domaine C-terminal de FtsK (Hojgaard et al., 1999). Cela pourrait être dû au fait qu'en se fixant sur le site *dif*, les recombinases XerC et XerD forment une structure pour laquelle la TopoIV a une plus forte affinité que pour le reste du chromosome.

De plus, une interaction physique entre le domaine C-terminal de FtsK et la sous-unité ParC de la TopoIV a été mise en évidence par une approche de double hybride (Espéli et al., 2003a). Cette interaction stimule l'activité de décaténation de la TopoIV *in vitro*, indépendamment de la capacité de translocation de FtsK (Bigot and Mariani, 2010; Espéli et al., 2003a). Cela suggère que la stimulation n'est pas due à un changement de conformation de l'ADN provoqué par la translocation de FtsK sur l'ADN qui crée un substrat préférentiel pour la TopoIV mais à un autre mécanisme encore inconnu.

Le fait que *dif* et le domaine C-terminal de FtsK soient essentiels à la stabilisation du mutant possédant l'allèle *parEts* (mutation thermosensible) par une surproduction de DnaX (Espéli et al., 2003b) est aussi un argument en faveur d'un lien fort entre FtsK, la recombinaison XerCD/*dif* et la TopoIV. Pour finir, lorsque l'activité de la TopoIV est altérée, la recombinaison XerCD/*dif* semble capable, *in vitro* et *in vivo*, de décaténer les chromosomes frères en réalisant plusieurs cycles de recombinaison à la suite (Grainge et al., 2007).

3.3. Le « *Ter Linkage* » et le positionnement de l'anneau Z

Nous avons vu précédemment que le « *Ter Linkage* » (= la chaîne d'interaction ADN-MatP-ZapB-ZapA-FtsZ, Figure 39) permettait de maintenir la région *ter* au centre de la cellule à la fin de la réplication, pendant les étapes tardives du cycle cellulaire. Récemment, lors de l'analyse de la mise en place de l'anneau Z en absence de SlmA et de MinCDE, les deux seuls régulateurs négatifs de la mise en place de l'anneau Z connus à l'heure actuelle, il a été mis en évidence que le « *Ter Linkage* » était un régulateur positif de la mise en place de l'anneau Z (Bailey et al., 2014)

En effet, dans une souche $\Delta slmA \Delta min$ en condition de croissance lente, l'anneau Z est capable de se positionner, dans la majorité des cellules, au centre de la cellule (Bailey et al.,

2014). L'anneau Z, dans ces conditions-là, co-localise avec le centre du nucléoïde, et plus particulièrement avec la région *ter* du chromosome. La colocalisation de l'anneau Z avec le centre du nucléoïde intervient dès les phases précoces du cycle cellulaire, avant même le bilobage du nucléoïde, et donc la relocalisation de la région *ter* du chromosome au centre de la cellule (voir partie 2.5.2). De plus, on observe une très forte colocalisation de l'anneau Z avec MatP, quel que soit le positionnement de MatP, et donc de la région *ter*, dans la cellule (Bailey et al., 2014). Cette colocalisation de l'anneau Z avec la région *ter* nécessite la présence du domaine C-terminal de MatP, impliqué dans l'interaction avec ZapB, ainsi que la présence de ZapB et de ZapA, soit les différents acteurs du « *Ter Linkage* »

Alors que jusqu'à présent, on pensait que le « *Ter Linkage* » n'avait que comme seule fonction l'ancrage de la région *ter* au divisome après la mise en place de l'anneau Z (Espéli et al., 2012), les données obtenues en time-lapse montrent que la région *ter* se localise au centre de la cellule avant la mise en place de l'anneau Z (Bailey et al., 2014). Cette relation temporelle indique que la région *ter* permet de positionner les protéines du divisome au centre de la cellule en contrôlant positivement la localisation de l'anneau Z via MatP, ZapB et ZapA.

Le « *Ter linkage* » permettrait donc de déterminer la position de l'anneau Z, et dans le même temps de stabiliser la position de la région *ter* au centre de la cellule, après la formation de l'anneau Z, et donc de coupler la ségrégation du chromosome avec la division cellulaire.

I. Résultats

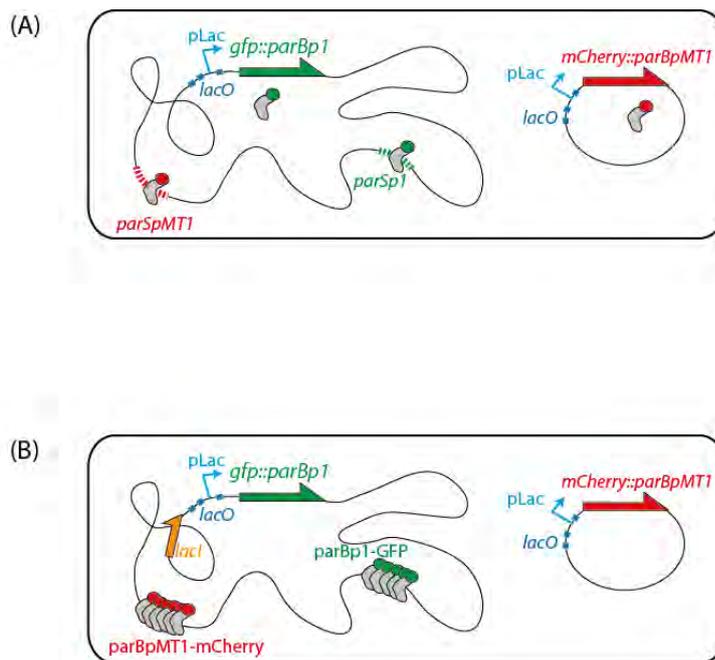


Figure 46 : Système de double localisation utilisé pour analyser le positionnement des loci

(A) Les fusions *gfp::parBp1* et *mCherry::parBpMT1* sont sous le contrôle du promoteur *pLAC*, sur le chromosome et sur un plasmide bas nombre de copies. Les protéines de fusions *ParBp1-GFP* et *ParBpMT1-mCherry* reconnaissent spécifiquement et respectivement les sites *parSp1* et *parSpMT1* insérés sur le chromosome. (B) La fixation coopérative de plusieurs protéines de fusion sur un site *parS* permet la visualisation des foci en microscopie optique à fluorescence. Ce système

1. Partie 1 : Rôle de MatP dans le positionnement du chromosome et le contrôle de la division cellulaire

1.1. Méthodes d'analyse du positionnement du chromosome

1.1.1. Système de localisation de deux loci chromosomiques dans la même cellule

Afin de localiser en même temps deux loci chromosomiques distincts, j'ai utilisé pendant ma thèse le système de double localisation ParB/*parS* optimisé par Mathieu Stouf, pendant sa thèse dans l'équipe de François Cornet (Stouf et al., 2013).

Les systèmes ParABS interviennent dans la ségrégation de nombreux plasmides, ainsi que dans la ségrégation des origines de réplication chez 65% des espèces bactériennes (*E. coli* ne possède pas de système ParABS pour la ségrégation d'*oriC*). La grande majorité des systèmes ParABS chromosomiques ne sont pas essentiels à la ségrégation des chromosomes. Les systèmes ParABS sont des systèmes à 3 composants constitués : (i) d'une séquence centromérique *parS*, (ii) d'une protéine de liaison à l'ADN ParB et (iii) d'une protéine moteur ParA. Une protéine ParB va reconnaître spécifiquement son propre site *parS*, puis d'autres protéines ParB vont venir se fixer de part et d'autre de la séquence *parS*, de manière coopérative. Les séquences *parS* sont des séquences courtes (entre 20 et 80pb, en fonction de la présence ou non de motifs supplémentaires) mais variables, en fonction des systèmes ParABS.

Afin de pouvoir marquer deux loci chromosomiques en parallèle dans la même cellule, nous avons utilisé deux systèmes Par différents : le système Par du bactériophage P1 et le système Par du plasmide pMT1. Les séquences *parSp1* et *parSpMT1* sont introduites à différentes position sur le chromosome par différentes techniques de transgénèses. Ces séquences sont reconnues par les protéines de fusion ParBp1-GFP et ParBpMT1-mCherry (Figure 46). Il a précédemment été décrit que le système *parSp1*/ParBp1 induisait une surcohésion de la région d'insertion du site *parS*, lorsqu'il y a une trop grande quantité de protéine ParBp1 dans la cellule.

Pour limiter cette sur-cohésion, la fusion *gfp::parBp1* a été placée à la place du gène *lacZ* chromosomique. En condition lente de croissance, il y a donc au maximum 2 copies de la fusion par cellule. Pour observer en microscopie optique à fluorescence uniquement un locus chromosomique marqué avec un *parSp1*, seulement 50µM d'IPTG sont nécessaires.

Pour visualiser deux loci en même temps, l'un marqué avec un *parSp1* et l'autre marqué avec un *parSpMT1*, nous utilisons, en plus de la fusion *gfp::parBp1* sous la dépendance du promoteur *pLac* chromosomique, une fusion *mCherry::parBpMT1* placée sur un plasmide dérivé du pLN135 (origine de répllication thermosensible dérivée de pSC101, faible nombre de copies, Figure 46), sous la dépendance de la région promotrice de l'opéron *lac*, avec les opérateurs *lacO* sauvages. Lorsque ce plasmide est utilisé, il n'est pas nécessaire d'induire avec de l'IPTG, puisque les répresseurs transcriptionnels LacI, qui se fixent sur les opérateurs *lacO*, sont titrés à la fois par la région promotrice de l'opéron *lac* chromosomique mais aussi par les opérateurs présents sur le plasmide. Cela permet une transcription suffisante des deux fusions *gfp::parBp1* et *mCherry::parBpMT1* pour une visualisation des foci en microscopie.

Ces deux systèmes de visualisation sous le contrôle du promoteur *pLac*, au locus ou sur un plasmide, ont été comparé au système FROS (pour « Fluorescent Repressor Operator System », système basé sur la fixation de la protéine TetR au niveau des opérateurs *tetO*), qui n'induit pas de cohésion supplémentaire au locus marqué. Les résultats obtenus montrent que les deux systèmes Par ainsi contrôlés n'induisent pas de cohésion supplémentaire pour un même locus marqué, et peuvent donc être utilisés pour faire de la double localisation en microscopie optique à fluorescence (Stouf et al., 2013).

1.1.2. Analyses en microscopie optique à fluorescence

Les différentes expériences de double localisation *in vivo* ont été réalisées en condition lente de croissance, afin de ne pas avoir de cycle cellulaire chevauchant et donc d'avoir, en condition sauvage, 1 ou 2 copies d'un locus chromosomique donné. Pour cela, les souches ont été cultivées en milieu minimum M9 avec de l'alanine (M9 ala) comme source de carbone à 30°C, étant donné que le plasmide utilisé pour exprimer la fusion *ParBpMT1* a une origine de répllication thermosensible.

Pour chaque acquisition, les souches ont été cultivées jusqu'à une DO (Densité Optique) de 0,2 à 0,4 à 600nm puis déposées sur lame M9 ala avec 1% d'agarose. Pour l'ensemble des acquisitions, aucune population n'a été synchronisée, toutes les étapes du cycle cellulaire sont donc présentes en même temps, sur un même plan.

Les acquisitions ont principalement été faites sur un microscope optique inversé Ti-E/B (Nikon®) avec un objectif à immersion 100x plan apochromatique avec une ouverture numérique de 1,45. La source lumineuse est une lampe à LED (Lumencor®) à intensité réglable. Les filtres utilisés sont les filtres FITC et mCherry. Chaque échantillon est excité environ 200ms pour le contraste de phase, et entre 500ms et 1s pour les filtres FITC et mCherry. Les images ont été acquises avec une caméra Néo sCMOS (Andor®) par le biais du logiciel d'imagerie Nis-elements AR4.4 (Nikon®).

1.1.3. Traitement semi-automatisé des images

1.1.3.1. Traitement des images en contraste de phase

Les images obtenues sont au format NIS (extension *.nd2*). Afin de pouvoir les analyser avec MicrobeTracker, il faut tout d'abord les convertir avec le logiciel Nis-elements ou le logiciel Nis-Viewer (Nikon®) en format TIFF (*.tif*). Le fichier au format NIS contient les trois acquisitions faites : le signal mCherry, le signal GFP et le contraste de phase. La conversion au format TIF génère 3 fichiers indépendants.

Le logiciel MicrobeTracker (Sliusarenko et al., 2011), logiciel libre fonctionnant sous MatLab (MathWorks®), a été utilisé pour analyser de manière automatique les images prises en microscopie à contraste de phase (Figure 47A). Ce logiciel permet de compter le nombre de cellules, et permet de déterminer la longueur, le largeur, la courbure... de chaque cellule, de manière automatique, grâce à la reconnaissance des contours des cellules. La fonction utilisée pour lancer MicrobeTracker est la fonction *>MicrobeTrackerS*. L'algorithme utilisé pour la détermination des contours est l'algorithme *alg4ecoli2* (disponible sur le site de MicrobeTracker). Les images en contraste de phase prises le même jour pour une même souche sont chargées.

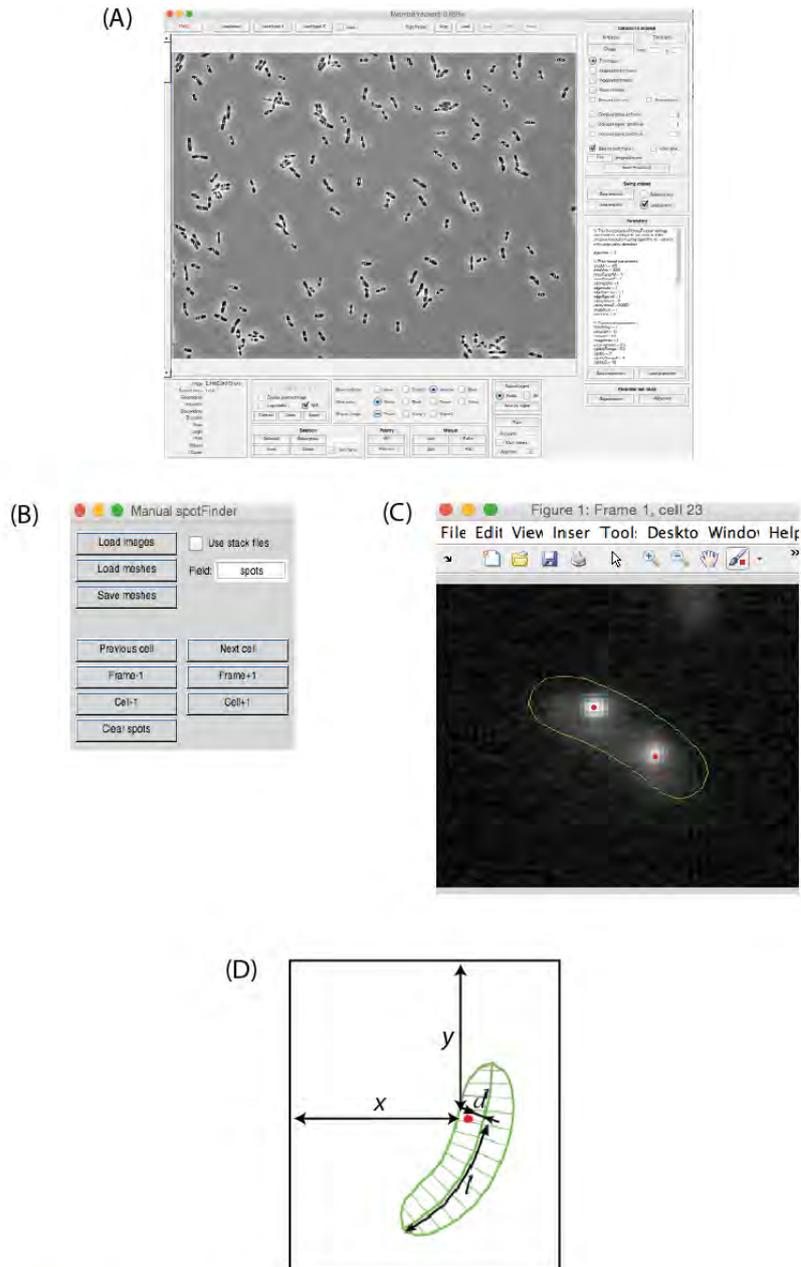


Figure 47 : Utilisation de MicrobeTracker et SpotFinderM

(A) Copie écran de MicrobeTracker après la fin d'une analyse automatique de la détection des contours des cellules. (B) Copie écran de l'interface d'utilisation de SpotFinderM permettant de charger les fichiers «meshes» générés précédemment par MicrobeTracker ainsi que les images du signal de fluorescence. (C) Copie écran de la fenêtre de défilement des cellules. Pour chaque cellule, il est nécessaire de cliquer au centre du ou des foci pour ensuite générer les informations concernant le spot. (D) Coordonées x , y , l et d obtenues pour chaque spot détecté via SpotFinder M.

Après avoir analysé la totalité des images chargées, MicrobeTracker génère un fichier « meshes » contenant les contours des cellules et toutes les informations rattachées.

Grâce à la fonction `>exportcells2xls` il est possible d'exporter les données générées par MicrobeTracker sous forme de matrice, dans laquelle chaque ligne correspond à une cellule, et les colonnes correspondent, dans l'ordre :

- Au numéro de l'image analysée
- Au numéro de la cellule
- A la taille de la cellule (en pixel)
- A l'aire de la cellule (en pixel²)
- Au volume de la cellule (en pixel³)
- A la largeur maximale de la cellule

Il est ainsi possible, à partir de ces données, de calculer la taille moyenne d'une population de cellules, de réaliser le diagramme de répartition de taille des cellules... soit directement avec MatLab (MathWorks®), soit avec Excel (Microsoft®).

1.1.3.2. *Traitement des signaux de fluorescence*

Le système de double localisation *parS*/ParB-XFP permettant de visualiser des foci en microscopie optique à fluorescence, j'ai utilisé le logiciel libre SpotFinderM (appartenant à la suite MicrobeTracker), qui permet de détecter manuellement les spots, après avoir chargé l'image du signal GFP ou mCherry, ainsi que le fichier « meshes » généré par MicrobeTracker. Après avoir lancé SpotFinder avec la fonction `>SpotFinderM`, et chargé les fichiers nécessaires (Figure 47B), une nouvelle fenêtre permet de faire défiler les cellules une par une, et de cliquer sur chaque focus détecté (Figure 47C). SpotFinderM va ensuite générer un nouveau fichier « meshes GFP » ou « meshes mCherry » contenant à la fois les informations obtenues avec MicrobeTracker ainsi que toutes les informations concernant les spots GFP ou mCherry détectés.

Grâce à la fonction `>exportspots2xls` il est possible d'exporter les données générées par MicrobeTracker sous forme de matrice, dans laquelle chaque ligne correspond à une cellule, et les colonnes correspondent, dans l'ordre :

- Au numéro de l'image analysée
- Au numéro de la cellule
- Au numéro du spot dans la cellule
- A la coordonnée en x du spot (Figure 47D)
- A la coordonnée en y du spot (Figure 47D)
- A la coordonnée en l (projection sur la ligne centrale de la cellule) (Figure 47D)
- A la coordonnée relative dans la longueur de la cellule (l divisé par la longueur de la cellule)
- A la distance d séparant le spot de la ligne centrale de la cellule (Figure 47D)

Comme pour MicrobeTracker, les données peuvent ensuite être exportées sous Excel (Microsoft®) afin d'être analysées, ou directement analysées avec MatLab (MathWorks®).

1.1.3.3. Traitement des données obtenues

MicrobeTracker et SpotFinderM permettent une semi-automatisation du traitement des images obtenues en microscopie, ce qui permet, en un laps de temps restreint, d'analyser un grand nombre de cellules, et d'obtenir un grand nombre de données brutes, qu'il faut ensuite analyser. De plus, lorsque l'on fait l'analyse avec MicrobeTracker puis avec SpotFinderM pour les foci GFP puis pour les foci mCherry, les informations se retrouvent stockées dans 3 fichiers indépendants.

J'ai, au début de ma thèse, commencé à analyser les données brutes manuellement sous Excel (Microsoft®), ou avec les quelques scripts déjà existants dans la suite MicrobeTracker. Je me suis rapidement aperçue que l'analyse manuelle ne permettait pas d'extraire rapidement et simplement les informations dont nous avons besoin, et qu'il n'existait pas de scripts répondant à nos attentes. En collaboration avec Alain Kamgoué, ingénieur d'études Calcul Scientifique au sein du laboratoire et spécialiste de Matlab (MathWorks®), j'ai développé, pendant ma thèse, de nombreux scripts permettant d'analyser de manière rapide

les données brutes obtenues et permettant de répondre aux questions biologiques soulevées. Ici, je vais faire une présentation rapide des scripts les plus importants développés durant ma thèse et utilisés pour obtenir les résultats présentés par la suite :

- [script_elise_foci](#)

Ce script permet d'obtenir le nombre de cellules avec x foci GFP et x foci mCherry. Pour cela, après avoir lancé le script, il faut charger le fichier « meshes GFP » puis le fichier « meshes mCherry ». On obtient les résultats sous forme de matrice, avec la première colonne correspondant au nombre de foci GFP, la seconde au nombre de foci mCherry et la dernière au nombre de cellules appartenant à cette catégorie. Parmi toutes les combinaisons possibles, 4 catégories de cellules vont par la suite retenir toute notre attention (Figure 48A):

- Les cellules avec 1 focus GFP et 1 focus mCherry
- Les cellules avec 1 focus GFP et 2 foci mCherry
- Les cellules avec 2 foci GFP et 1 focus mCherry
- Les cellules avec 2 foci GFP et 2 foci mCherry

- [script_elise_nettoy](#)

Lors de l'analyse des foci avec SpotFinderM, un certain nombre de spots ne peuvent pas être correctement détectés. Il y a donc un certain nombre de cellules qui ne contiennent aucun foci GFP détectable ou aucun foci mCherry détectable, voir aucun foci du tout. Il est possible de connaître le nombre de ces cellules grâce au script précédent. Ce script permet de générer un nouveau fichier « meshes » ne contenant plus les cellules sans signal, ou avec un seul des deux signaux.

- [script_elise_undeuxplus](#)

Lorsque l'on extrait les informations des fichiers « meshes GFP » ou « meshes mCherry » sous forme de matrice, les cellules sont toutes dans la même matrice, qu'elles aient 1, 2, 3, 4... foci GFP ou mCherry.

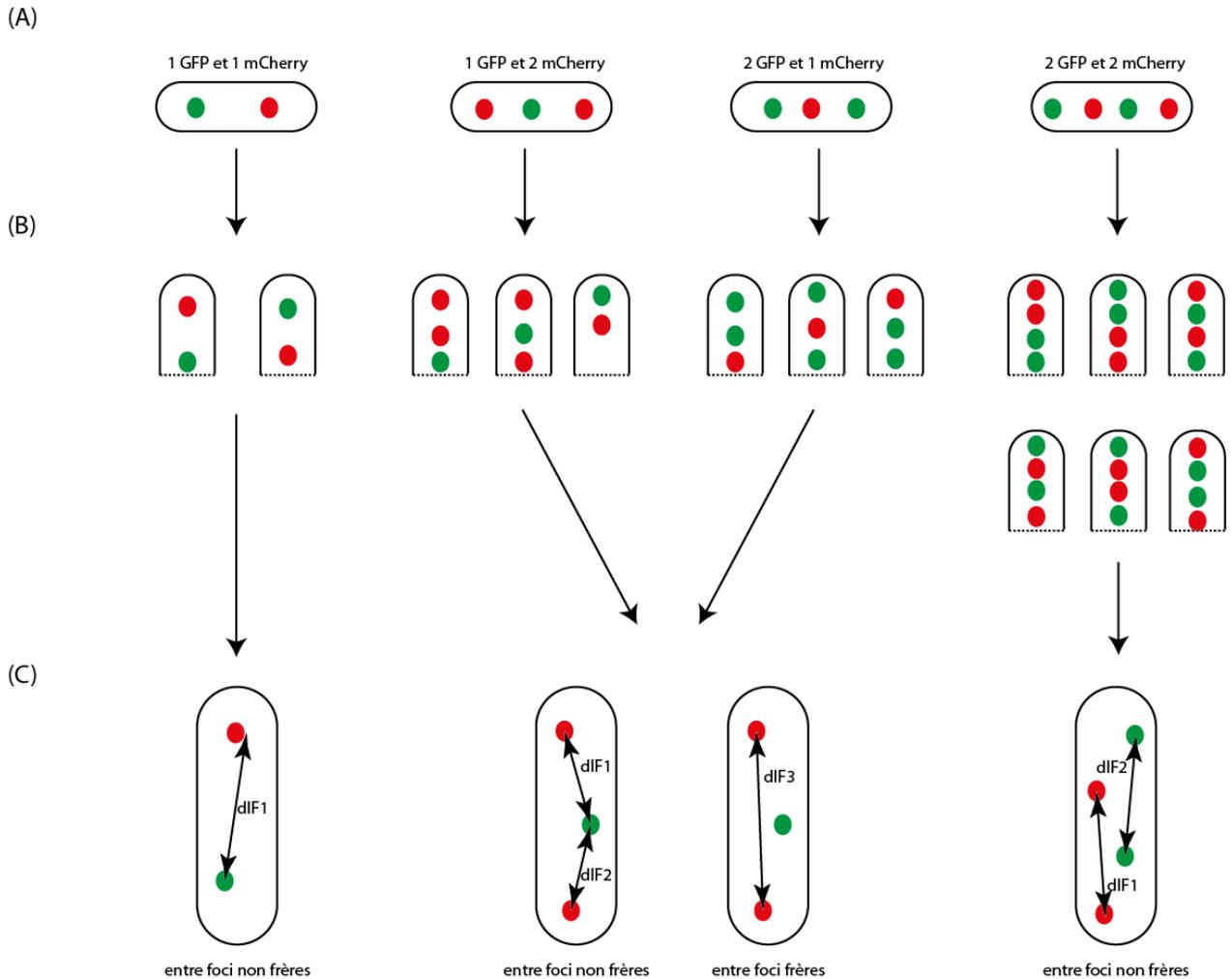


Figure 48 : Illustration des analyses possibles avec les scripts développés sous Matlab

(A) Le script «script_elise_foci» permet de connaître le nombre de cellules appartenant à chaque catégorie représentée. (B) Le script «script_elise_positionaucentre» permet de savoir quel est l'ordre des foci, du centre de la cellule au pôle, et de savoir les effectifs de chaque catégorie de cellules. (C) Le script «dist_foc_elise» permet de calculer différentes distances interfocales, entre foci frères ou foci non frères, en fonction des différentes catégories de cellules.

Afin de pouvoir analyser les cellules avec seulement 1 focus indépendamment des cellules avec 2 foci, ce script permet de générer plusieurs matrices différentes : une matrice avec seulement les cellules à 1 focus, avec toujours les mêmes informations pour chaque cellule, une matrice avec les cellules à 2 foci, et ainsi de suite.

- [script_elise_positionaucentre](#)

Ce script permet de déterminer la position des différents foci dans la cellule, du plus central au plus polaire, pour 4 catégories de cellules. Les résultats sont obtenus sous forme de 4 matrices différentes pour les 4 principales catégories de cellules. Dans chaque matrice, la première colonne correspond à l'ordre des foci du centre vers le pôle et la seconde colonne au nombre de cellules appartenant à cette catégorie (Figure 48B).

- [dist_foc_elise](#)

Ce script permet de calculer la distance interfocale réelle entre deux foci (en pixel) ainsi que la distance interfocale relative (i.e. rapportée à la longueur de la cellule) comprise entre 0 et 1, quelle que soit la taille de la cellule.

Pour la catégorie de cellules avec 1 GFP et 1 mCherry, il permet de calculer la distance interfocale entre le focus GFP et le focus mCherry (2 foci non frères). Pour les catégories de cellules avec 2 GFP et 1 mCherry ou avec 1 GFP et 2 mCherry, il permet de calculer, pour chaque cellule, 3 distances interfocales : la distance interfocale entre les deux foci frères (les 2 GFP ou les 2 mCherry) mais aussi entre 1 focus mCherry et 1 focus GFP. Pour les cellules avec 2 GFP et 2 mCherry, le script permet uniquement de calculer deux types de distances interfocales : les deux distances interfocales entre foci frères. A l'heure actuelle il ne permet pas de calculer les distances interfocales entre foci non-frère (Figure 48C).

- [comp_distr_taille](#)

Ce script permet de comparer deux distributions de taille de deux populations de cellules différentes, et de déterminer si les deux distributions sont différentes ou non. Pour comparer les deux distributions de taille, le script permet tout d'abord de générer les courbes des fréquences cumulées croissantes en fonction de la taille des cellules (en pixel).

Ensuite, le script permet de réaliser un test d'ajustement statistique de Kolmogorov-Smirnov de type 2 (KS-2). Ce test permet de comparer une distribution contre une autre, en mesurant l'écart maximum entre deux fonctions de répartition empirique (valeur d). L'utilisation de ce test permet de calculer la « p-value », qui correspond à la probabilité d'obtenir la même valeur d ou une valeur d encore plus extrême du test si l'hypothèse nulle H_0 est vraie (l'hypothèse nulle est que les deux échantillons sont identiques, et donc que d tend vers 0). La valeur de « p-value » permet de rejeter, avec plus ou moins de présomption, l'hypothèse nulle. Généralement, on utilise les seuils suivants comme référence :

- $p\text{-value} < 0,01$ = très forte présomption contre l'hypothèse nulle
- $0,01 < p\text{-value} < 0,05$ = forte présomption contre l'hypothèse nulle
- $0,05 < p\text{-value} < 0,1$ = faible présomption contre l'hypothèse nulle
- $p\text{-value} > 0,1$ = pas de présomption contre l'hypothèse nulle

- [comp_distr_foci](#)

Ce script permet de comparer la distribution des foci dans la longueur de la cellule entre deux populations. Il est du même type que le script présenté précédemment, sauf que cette fois-ci on ne regarde pas la taille des cellules, mais la position relative des foci dans la cellule. Avant de pouvoir utiliser ce script, il faut préalablement utiliser le script `>compteur_spot_Alain231JR` qui permet, à partir d'un seul fichier « meshes GFP » ou « meshes mCherry », de créer plusieurs fichiers « meshes » avec les cellules à 1 focus, 2 foci, 3 foci... Les courbes des effectifs cumulés croissants pour les cellules à 1 focus, puis pour les cellules à 2 foci, sont générées comme précédemment, et un test de KS-2 est ensuite réalisé sur ces distributions, pour comparer la position d'un ou de deux foci, entre deux souches différentes.

1.2. « The MatP protein controls chromosome orientation and cell division in *E. coli* »

1.2.1. Présentation du manuscrit

Au début de ma thèse, nous savions que la région terminale du chromosome présentait une organisation et une dynamique précises au cours du cycle cellulaire, et que cela était dû à la présence de la protéine MatP, qui se fixe sur les sites *matS* présents uniquement dans cette région. Un des objectifs de ma thèse était de comprendre en quoi cette organisation de la région *ter* et cette dynamique particulière sont importantes pour le bon déroulement du cycle cellulaire.

Pour répondre à cette question, nous avons étudié la ségrégation, le positionnement et l'orientation du chromosome en présence ou en absence de MatP, principalement en microscopie optique à fluorescence. Cela nous a permis de mettre en évidence que MatP n'impactait pas uniquement la ségrégation et la localisation de la région terminale du chromosome, mais influençait aussi l'orientation et la localisation globale du chromosome. Nous avons ensuite regardé quelles pouvaient être les conséquences d'un mauvais positionnement du chromosome. Nous avons montré qu'en absence de MatP, le mauvais positionnement du chromosome provoque un retard de division cellulaire, dû à la présence du facteur d'occlusion par le nucléoïde SlmA au centre de la cellule, à la fin de la réplication. MatP est donc impliquée dans l'organisation globale du chromosome, et dans le couplage avec la division cellulaire.

1.2.2. Manuscrit

The MatP protein controls chromosome orientation and cell division in *Escherichia coli*.

Elise Lebailly, Mathieu Stouf, Carine Pagès, Phan Thai Nguyen Le and François Cornet*

Laboratoire de Microbiologie et de Génétique Moléculaires, CNRS, F-31000, Toulouse, France.

Université de Toulouse, Université Paul Sabatier, F-31000, Toulouse, France.

* To whom correspondence should be addressed.

Tel : (33) 561 335 985; Fax : (33) 561 335 886; email : Francois.Cornet@ibcg.biotoul.fr;

IBCG, Université Paul Sabatier, 118, route de Narbonne, F-31062, Toulouse Cedex 09, France

Running title: MatP controls nucleoid orientation

Introduction

Faithful cell proliferation requires that at least one copy of the genome is transmitted to sister cells prior to cell division. A tight spatial and temporal coupling of chromosome segregation with cell division is thus required. Bacteria lack described mitosis apparatus and associated chromosome segregation checkpoints found in eukaryotes. Positioning of the chromosomes in pre-divisional cells is nevertheless accurate and the assembly of the cell division apparatus, the divisome, tightly controlled in time and space. Despite significant recent advances, the way these two processes are controlled and integrated remains partly understood.

In *Escherichia coli* as in most bacteria studied to date, chromosome replication occurs in the mid-cell zone, i.e., where the division septum will assemble (Wang et al., 2013). The early-replicated regions do not separate right after replication but remain juxtaposed. They then split and migrate towards the cell poles as part of a dramatic restructuring of the nucleoid called nucleoid splitting (Bates and Kleckner, 2005). Although different sister chromosome conformations may be adopted (Kleckner et al., 2014), the distance between sister loci decreases with increasing distance from the replication origin on the genetic map as a general tendency. Thus, in cell harbouring fully replicated sister chromosomes and about to divide (pre-divisional cells), origins regions (*ori*) are located towards cell poles whereas the opposite terminus regions (*ter*) stay closest to mid-cell. This *ori-ter* chromosome orientation appears primarily dictated by ParABS systems, acting in the *ori* region in *Caulobacter Crescentus*, *Bacillus subtilis* and *Vibrio cholerae* (David et al., 2014; Le et al., 2013; Wang et al., 2015). *E. coli*, however, lacks a described chromosomal ParABS system. On the other hand, functions specific of the *ter* region are also crucial for chromosome dynamics. These functions have been mostly studied in *E. coli*. The *E. coli ter* region contains *matS* sites at which the MatP protein binds (Mercier et al., 2008). MatP bind *matS* sites as a dimer and can form tetramers gathering

two *matS* sites (Dupaigne et al., 2012). It also interacts with the divisome-associated ZapB protein (Espéli et al., 2012) and with the MukBEF condensing complex (Nolivos et al., 2016). The respective and overlapping roles of these different interactions are still to be precisely established. It is nevertheless clear that together they: (i) self-condense the *ter* region; (ii) keeps the *ter* regions juxtaposed at mid-cell during the post-replicative period (Männik et al., 2016); (iii) control the segregation of sister *ter* regions and couple it to cell division by modulating the activities of TopoIV (Nolivos et al., 2016) and FtsK (Stouf et al., 2013).

In *Escherichia coli*, the divisome precisely assembles at mid-cell, driven by the assembly of FtsZ polymers (Tsang and Bernhardt, 2015) (Rico et al., 2013) (Monahan et al., 2014). This localisation is primarily controlled by two mechanisms. The Min system patterns the rod cell periphery to prohibit divisome assembly near the cell poles. The SlmA protein inhibits divisome assembly over the chromosome in a process called nucleoid occlusion (Bernhardt and de Boer, 2005). SlmA binds specific sites, the SBS, scattered around the chromosomes (Tonthat et al., 2011)(Cho et al., 2011). Although the mechanism used remains controversial, it is clear that SlmA inhibit the formation of the FtsZ polymers required for cytokinesis and that this activity is largely stimulated by its binding to SBS sites (Cho and Bernhardt, 2013; Cho et al., 2011; Du and Lutkenhaus, 2014; Tonthat et al., 2011, 2013). SBS are absent from the *ter* region, which certainly helps to move them away from mid-cell during normal chromosome segregation. Indeed, sister *ter* regions show higher post-replicative co-localisation and are the only chromosome part located in the mid-cell area in cells about to divide. Their segregation depends on divisome assembly, in particular of activation of the FtsK protein and this process requires MatP (Stouf et al., 2013). Consistent with DNA-bound SlmA exclusion from mid-cell at this step is also the absence of division inhibition by dimeric chromosomes of which the *ter* regions cross the septal plane (Hendricks et al., 2000).

In this paper, we show that MatP is required for normal positioning and orientation of the whole chromosome in pre-divisional *E. coli* cells. Defects in chromosome positioning and orientation induce division inhibition by miss-positioned SlmA.

Fig. 1

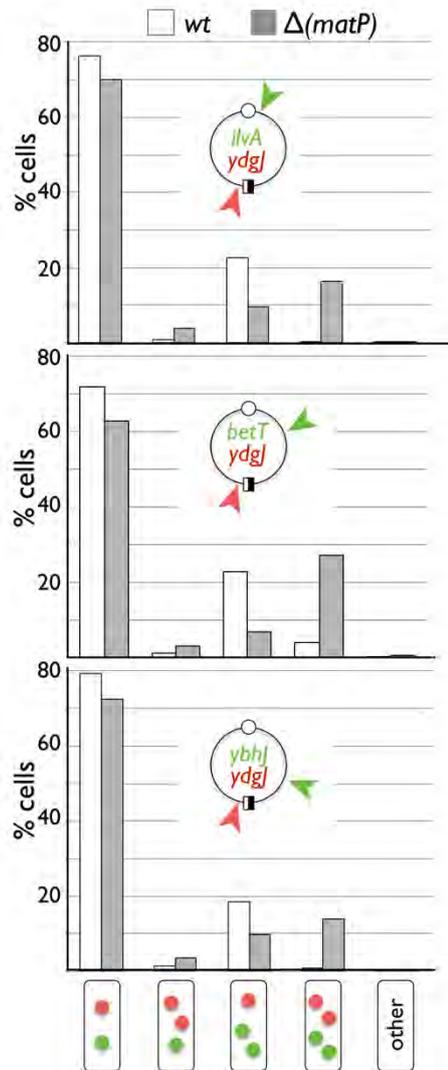


Figure 1 : Pattern of segregation in $\Delta(matP)$ strains.

Inset maps show the pairs of loci tagged with *parSpMT1* (red) or *parSP1* (green). Names of tagged loci are indicated as well as the replication origin (open circle) and the *dif* site (black and white square). Cells were classified depending on their number of foci of each locus (cartooned on the x-axis, the "other" cell indicate cells that fall in none of the first four categories). Bars show the mean percentage of each category in the population (y-axis; 2 independent experiments, between 563 and 1125 cells per experiment).

Results and discussion

Chromosome segregation pattern in $\Delta(matP)$ strains

Defects in chromosome positioning may be due to perturbed replication, segregation pattern (i.e., the relative segregation times of the different chromosome regions) or post-replicative positioning (i.e., the "home position" of the chromosome regions after segregation). Chromosome replication have been shown to be mostly unperturbed in a $\Delta(matP)$ strain compared to wt strains (Mercier et al., 2008). The segregation times of non-*ter* loci (chromosome loci located outside the *ter* region) were also mostly unaffected by MatP inactivation (Mercier et al., 2008). This was assayed using the bacteriophage P1 ParB/*parS*-derived localisation system tagging a single loci per strain (Nielsen et al., 2006). We re-investigated the segregation times of chromosome loci in $\Delta(matP)$ strains using pairs of loci tagged with *parS*_{P1} and *parS*_{pMT1} sites recognized by cognate ParB-based fluorescent proteins (Nielsen et al., 2006). The *ter* region was tagged with a *parS*_{pMT1} insertion at locus *ydjJ* (1702 kb) and chosen non-*ter* loci were tagged with *parS*_{P1} insertions at loci *ilvA* (3955 kb), *betT* (330 kb) or *ybhJ* (805 kb). The mCherry-ParB_{pMT1} and GFP-ParB_{P1} fusion proteins were produced from the chromosome and a low-copy number plasmid, respectively, under control of *lacZp* promoters without inducer addition. This allows avoiding the segregation delays provoked by these systems under conditions of higher protein production (Stouf et al., 2013). Strains carrying pairs of tagged loci were grown and observed in synthetic medium to facilitate the observation of segregation events (Methods).

The mean number of foci per cell reflects the time separating loci segregation from cell division. As expected, the *ydjJ* locus segregated earlier in the $\Delta(matP)$ than in the wt strain (Fig. 1, compare the numbers of four-foci cells). The non-*ter* loci also segregated slightly earlier

Fig. 2

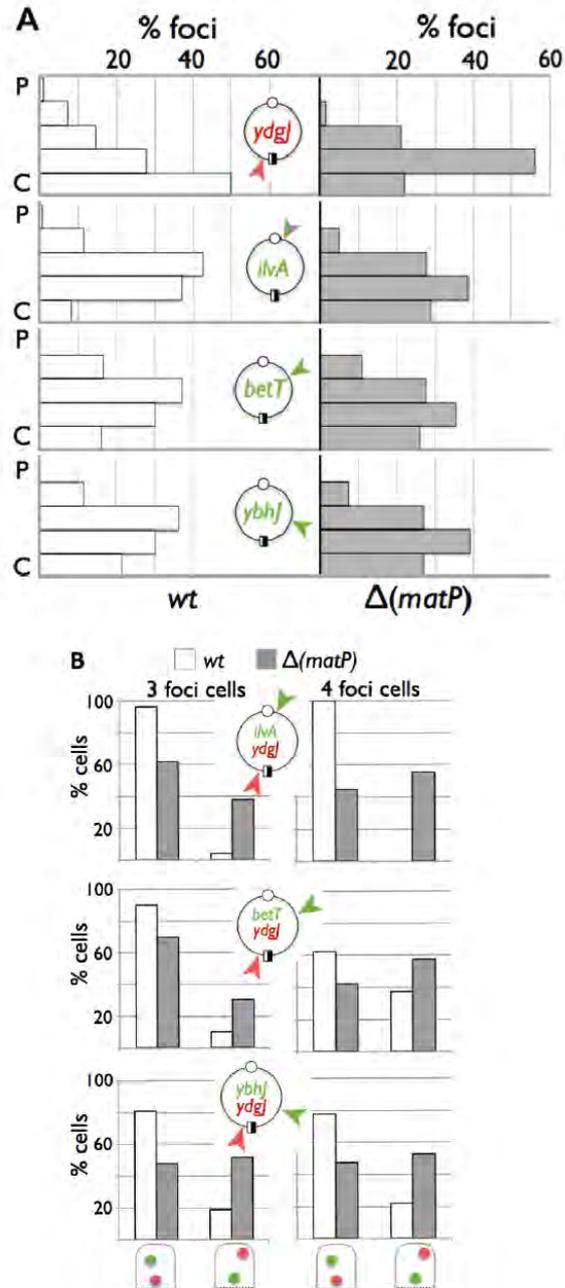


Figure 2 : MatP controls the orientation of the chromosome.

Inset maps show the loci tagged with parSpMT1 (red) or parSP1 (green). Names of tagged loci are indicated as well as the replication origin (open circle) and the dif site (black and white square). Only pre-divisional cells, harbouring at least two sister foci of one locus, were considered. Analyses of cells harbouring single foci are shown in Fig. S3. A) Foci were binned into five categories depending on their position on the long cell axis (x-axis; C: cell centre; P: cell pole). The percentage of foci in each category is shown for wt (left) and $\Delta(matP)$ (right) strains (y-axis). B) Cells were binned into two categories depending on which focus is closest from mid-cell (x-axis). Left panels show the percentage of cells in each category (y-axis) for cells with three foci and right panels for cells with four foci. Open bars: wt cells; grey bars: $\Delta(matP)$ cells.

(Fig. 1, compare the numbers of two-foci cells), consistent with delayed cell division due to MatP inactivation (see below). Pairs of tagged loci allow direct comparison of their segregation times. The times between segregation of the *ydjJ* and the non-*ter* loci was reduced in $\Delta(matP)$ strains, resulting in an increase of four-foci cells and a decrease in three-foci cells (Fig. 1). This again was consistent with delayed segregation of *ter* loci due to MatP. Cells harbouring two foci of *ydjJ* and one of the non-*ter* loci were more frequent in $\Delta(matP)$ strains (Fig. 1). This increase was however moderate and may be due to positioning defects, leading to apparent co-localisation of sister non-*ter* loci, rather than effective modification of their segregation times (see below). We conclude that inactivation of MatP has only moderate effects on the segregation times of non-*ter* loci. This confirms previously published data obtained using single tagged loci (Mercier et al., 2008).

Chromosome orientation is lost in $\Delta(matP)$ strains

We next analysed the intracellular positioning of chromosome loci in the same set of wt and $\Delta(matP)$ strains (Fig. 2). In pre-divisional cells (cells harbouring two foci), the *ydjJ* locus was located further from mid-cell in the $\Delta(matP)$ strain compared to the wt strain, consistent with early segregation of the *ter* region and delayed cell division in absence of MatP (Fig. 2A). Oppositely, the mean location of non-*ter* loci was shifted towards mid-cell (p-value = 4.10^{-5} ; 1.10^{-2} and 6.10^{-2} for *ilvA*, *betT* and *ybhJ*, respectively). Particularly, the presence of non-*ter* loci in the 1/5 of cell length closest from mid-cell significantly rose in all cases, consistent with MatP excluding the non-*ter* regions from the mid-cell area. We measured the interfocal distances between sister foci and corrected them by individual cell lengths to account for the cell length variations in $\Delta(matP)$ strains. In wt cells, interfocal distances decreased with increasing distances from the replication origin (Fig. S1). This pattern was lost in $\Delta(matP)$ cells.

Fig. 3

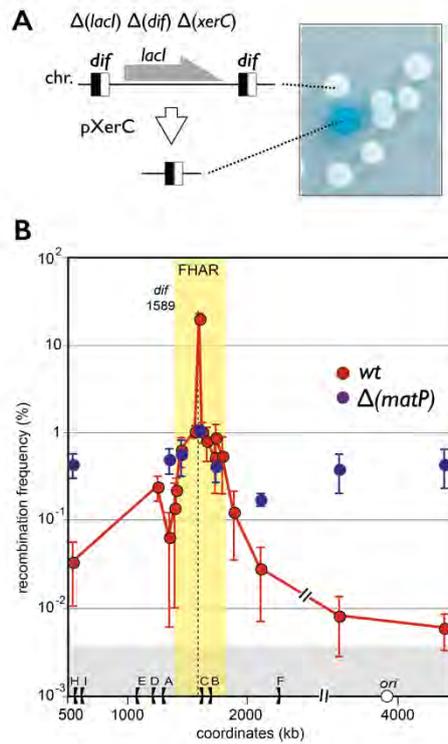


Figure 3 : MatP controls chromosome - divisome interactions.

A) System used. Two directly repeated *dif* sites flanking the *lacI* gene were inserted at different loci of a $\Delta(lacI) \Delta(dif) \Delta(xerC)$ strain. Recombination was induced by transformation with a XerC-producing plasmid and scored as the appearance of blue colonies on indicator medium (Methods). B) Recombination frequencies (y-axis) as a function of the position of cassette insertion (x-axis). Positions of the replication origin (*ori*, open circle) and terminators (black flags, lettered) are shown. The natural position of *dif* is indicated on the graph. Mean frequencies with standard deviations are plotted. Results from *matP*⁺ strains (*wt*, red dots and curve) are redrawn from (Deghorain et al., 2011). Blue dots and curve: $\Delta(matP)$ strains.

The inter-focal distance between sister-foci rose in the case of the *ydgJ* locus but decreased in the cases of *ilvA* and *ybhJ* loci in absence of MatP (Fig. S1). The interfocal distance between sister *betT* loci did not decrease but rose slightly in $\Delta(matP)$ cells, suggesting a peculiar behaviour of the NS-right region carrying *betT*. NS regions have been reported to show higher mobility and less accurate positioning compared to other chromosome regions (Espeli et al., 2008). In all cases, foci positioning in cells with a single focus was not significantly changed by MatP inactivation (Fig. S2).

We then directly analysed chromosome orientation by looking at the order of pairs of foci along the long axis of the cells (Fig. 2B). Cells were classified depending on their number of foci, then binned into two categories depending on which locus was closest from mid-cell. In young cells with two foci (one of each locus), orientation was close to random, with a faint tendency of the *ydgJ* locus to be closer from mid-cell than the non-*ter* loci (Fig. S2B). This tendency was inverted, yet remained moderate in $\Delta(matP)$ cells. In contrast, most pre-divisional cells harbouring three (two foci of the non-*ter* locus and one of *ydgJ*) or four foci (two foci of each locus) had *ydgJ* closest from mid-cell than the non-*ter* loci. This preferred pattern was highly perturbed in absence of MatP. Indeed, the distributions were close to random on most cases, indicating a loss of chromosome orientation. We conclude that MatP is required for normal chromosome orientation in pre-divisional cells.

MatP controls chromosome interaction with the divisome

To further analyse the loss of chromosome orientation due to MatP inactivation, we relied on a genetic trap measuring the relative frequencies of chromosome loci interaction with the divisome. This assay takes advantage of the strict dependency of XerCD/*dif* recombination on

Fig. 4

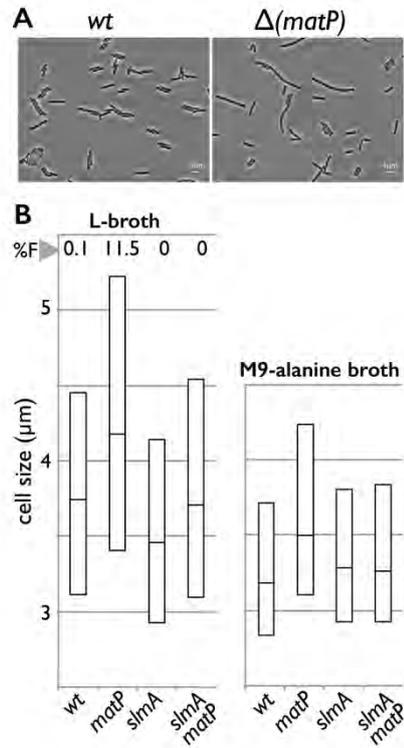


Figure 4 : SlmA inactivation suppresses division defects in $\Delta(matP)$ cells.

A) Micrographs of isogenic wt and $\Delta(matP)$ strains. B) Cell size distribution of strain carrying the indicated mutation (x-axis) in the two different indicated growth conditions. Medians with the first quartiles are shown (see Fig. S3 for complete data). The percentage of cell longer than 7 μm is given on the top line.

a direct interaction of XerD with the FtsK protein (Yates et al., 2006). Recombination between the directly repeated *dif* sites of a *dif-lacI-dif* cassette inserted at different loci reflects their relative frequencies of interaction with FtsK, activated by its association with the divisome. We previously reported that in otherwise wild type cells, loci located in a 400 kb region around the *dif* site interact preferentially with FtsK (Deghorain et al., 2011). This corresponds to the region which segregation pattern strictly depends on MatP and FtsK (Stouf et al., 2013). Strains carrying *dif-lacI-dif* cassettes at chosen loci were rendered $\Delta(matP)$ and recombination was scored (Methods, Fig. 3A). The resulting pattern was strikingly different than the pattern observed in the wild type strain. All loci tested displayed equivalent recombination frequencies, showing they all interacted with divisome-borne FtsK equally (Fig. 3B). MatP thus restricts FtsK activity to the *ter* region. In absence of MatP, other chromosome regions, normally excluded from mid-cell in dividing cells gain access to the divisome. This result confirms, using a functional assay, the loss of chromosome orientation in $\Delta(matP)$ strains.

Inactivation of MatP causes cell division inhibition by SlmA

The fact that chromosome orientation is lost in pre-divisional cells may provide an explanation to the division defect observed in $\Delta(matP)$ strains (Mercier et al., 2008). We hypothesized that nucleoid occlusion mediated by the SlmA protein may delay or block cell division in response to chromosome miss-orientation. To verify this hypothesis, we deleted *slmA* in otherwise wt and $\Delta(matP)$ strains and compared the cell size distribution of the resulting strains growing in rich or synthetic medium. In both conditions, the whole population of cells was shifted towards longer cells in absence of MatP (Fig. 4). Consistent with previous findings, a large increase in abnormal cells (filaments, here defined as $> 7\mu\text{m}$) was found only in rich medium. Surprisingly, $\Delta(slmA)$ cells were slightly shorter than wt in rich medium but

Fig. 5

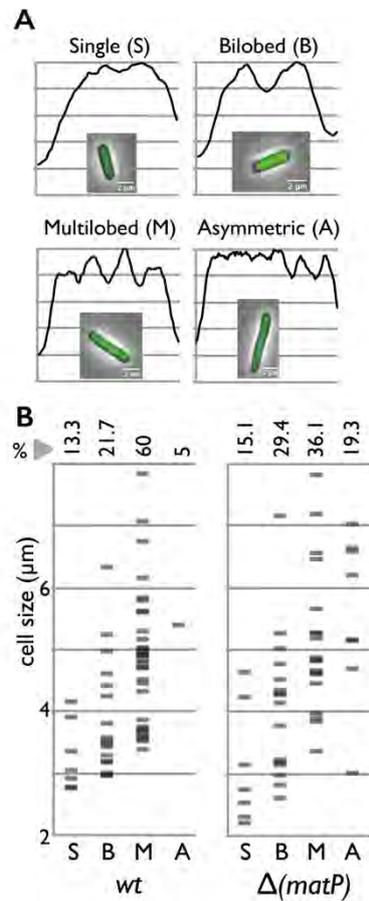


Figure 5 : MatP controls SlmA positioning.

A) Examples of localisations of a SlmA-GFP fusion protein (Methods) representative of the four categories indicated on the top of the graphs. Each graph shows a line scan of fluorescence from the cell shown in insets. X-axis: pixels; y-axis: fluorescence normalized to the most intense pixel (from 0, bottom line, to 100%, top line). B) Repartition of the four categories of nucleoid shapes (x-axis) as a function of cell length (y-axis). The percentage of each category is given on the top of the graphs. Left: wt cells; right: $\Delta(matP)$ cells. The same experiment using a HU-mCherry fusion protein is shown in Fig. S4.

slightly longer than wt in synthetic medium. This opposite effect may be explained by differences in FtsZ levels and in chromosome dynamics in these growth conditions. In synthetic medium, the main role of SlmA would be to make FtsZ available to the septal ring (Tonthat et al., 2013), whereas in rich medium, nucleoid occlusion would act in normal cell cycles, at least in a part of the population. In both growth conditions, inactivation of SlmA restored normal cell size in the $\Delta(matP)$ strain (Fig. 4). SlmA is thus the primary determinant of the cell division inhibition caused by MatP inactivation. Since the division inhibition activity of SlmA depends on its binding to SBS sites-containing DNA, these results are fully consistent with the loss of chromosome orientation we observed in $\Delta(matP)$ strains. Indeed, non-*ter* regions carrying division-inhibiting SlmA-SBS complexes are more often localised at mid-cell due to chromosome miss-orientation in $\Delta(matP)$ strains.

MatP is required for normal SlmA positioning

To directly compare the localisation of SlmA in wt and $\Delta(matP)$ strains, we used a SlmA-GFP produced under the control of the *lacZ* promoter from a chromosome-borne construct (Bernhardt and de Boer, 2005). The fluorescence intensity profiles obtained were binned into categories depending on their overall shape and their symmetry inside the cell (i.e., whether or not the distribution appears centred at mid-cell; Fig. 5A). Cells longer than 8 μ m frequently found in the $\Delta(matP)$ strain were ignored (Fig. 4). In both wt and $\Delta(matP)$ strains, non-constricted fluorescence patterns (single nucleoid, S in Fig. 5) were infrequent and most cells harboured bi-lobed (B) or multi-lobed (M) symmetrical patterns. The split patterns were found in longer cells than the single patterns and bi-lobed patterns were found in smaller cells than multi-lobed patterns, indicating a progressive splitting of SlmA with cell cycle progression. Indeed, symmetrical patterns should allow divisome assembly at normal places (i.e., at mid-

Fig. 6

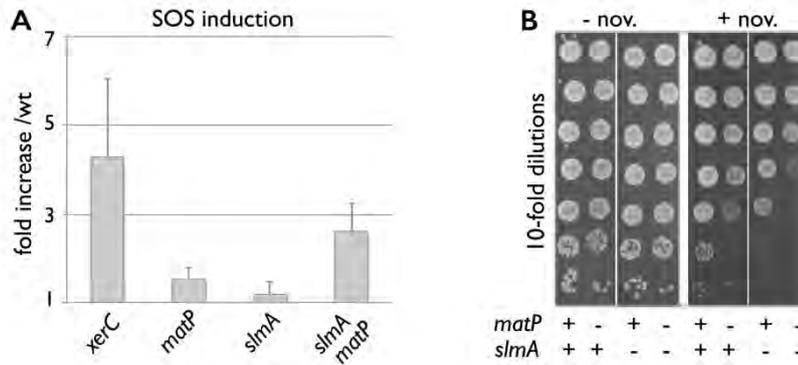


Figure 6: The MatP-SlmA interplay is important for chromosome management.

A) Relative induction of the *sfA* promoter reflecting SOS induction in the indicated strains (x-axis). Results are expressed as fold increase compared to the wt strain. Means with standard deviations are shown. B) Sensitivity to novobiocin of the indicated strains (x-axis). Serial 10-fold dilutions were spotted on L-agar plates containing (right) or not (left) 120 μ g/ml novobiocin.

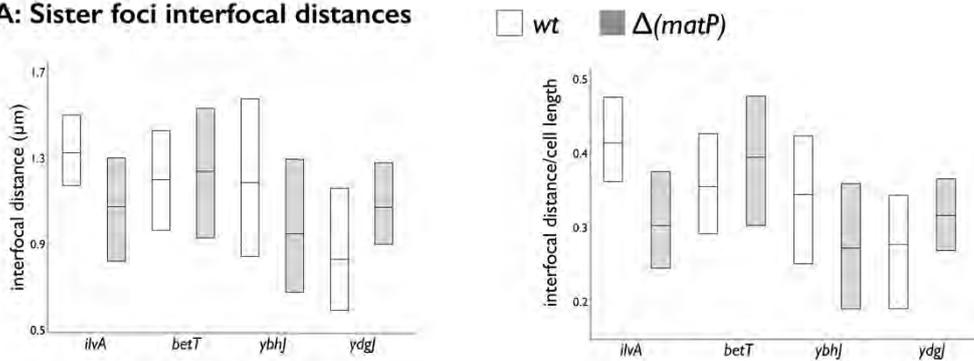
cell and then at the quarter positions for the next divisions). Multi-lobed patterns were under-represented in $\Delta(matP)$ cells compared to wt (Fig. 5B). Conversely, single and bi-lobed patterns raised, indicating a delay in SlmA segregation in $\Delta(matP)$ strains. Since most SlmA-GFP detected are thought to be DNA bound, this result suggested a delay in nucleoid splitting in $\Delta(matP)$ strains. To verify this hypothesis, we repeated the same experiment using a HU-mCherry fusion protein that binds over the entire nucleoid (Marceau et al., 2011). Results shown the same trend, with a decrease in multi-lobed patterns in the $\Delta(matP)$ strain (Fig. S4). We conclude that MatP inactivation delays nucleoid splitting. This delays the segregation of DNA-bound SlmA and consequently the release of nucleoid occlusion. Strikingly, asymmetric patterns (A in Fig. 5 and S4) were found most preferentially in the $\Delta(matP)$ strain. These include patterns with asymmetrically split nucleoids (Fig. 5A) and other with asymmetric position of the whole nucleoid (Fig. S4A). Again, the two fusion proteins shown the same localisation trend, suggesting asymmetric SlmA localisation is due to defects in nucleoid positioning in the $\Delta(matP)$ strain. Taken together, these results show that inactivation of MatP leads to inaccuracy of nucleoid positioning accompanied by defects in SlmA localisation in a significant proportion of cells.

The MatP-SlmA interplay is important for chromosome management

The observation that SlmA inactivation suppresses the cell division defects in the $\Delta(matP)$ strains raises the question of the advantage of keeping these two functions active in *E. coli*. This prompted us to observe phenotypes other than cell shape. We first measured SOS induction as a general reporter of chromosome management defects (Fig. 6A). As previously reported, SOS induction is weak in the $\Delta(matP)$ strain (Mercier et al., 2008). We compared to SOS-induction in a strain defective in chromosome dimer resolution by XerCD/*dif*

Fig. S1

A: Sister foci interfocal distances



B: Non-sister foci interfocal distances

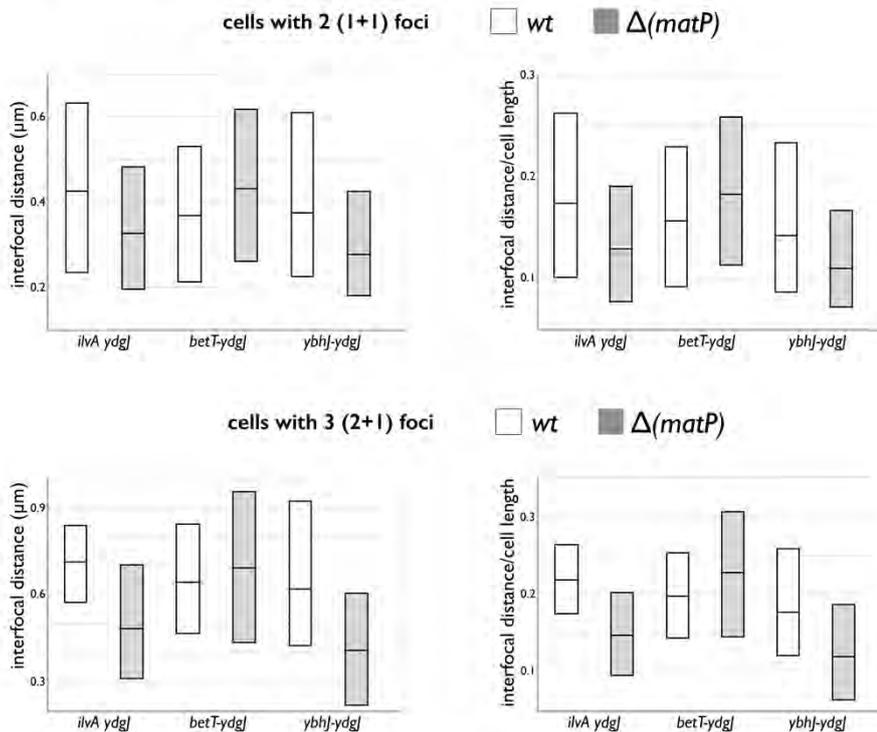


Figure S1 : Interfocal distances in wt and $\Delta(matP)$ strains.

A) Absolute values of interfocal distances (left panel) and interfocal distances corrected by cell size (right panel) between sister foci were calculated (methods) for the four foci used in this study (x-axes). B) Same calculations for non-sister pairs of foci (indicated on the x-axes) in cells harbouring two or three foci as indicated. Open bars: wt cells; grey bars: $\Delta(matP)$ cells.

recombination ($\Delta(xerC)$) into which 15 to 30 % of the cells are induced for this stress response (Hendricks et al., 2000). The weak induction in the $\Delta(matP)$ compared to the $\Delta(xerC)$ indicates that most chromosome dimers are resolved in absence of MatP, by XerCD/*dif* recombination or other means (Fig. 6A). Consistent with this view, inactivation of SOS induction using a *lexA*^{Ind-} mutation or inactivation of the SOS-induced division inhibitor, SfiA, did not suppress the cell size increase due to MatP inactivation (Fig.S4). SOS induction was also barely detectable in the $\Delta(slmA)$ strain, showing that the absence of SlmA does not provoked chromosome processing defects leading to extensive DNA degradation or recombinational repair. However, SOS induction was significantly enhanced in the $\Delta(matP) \Delta(slmA)$ double mutant compared to both single mutant (Fig. 6A). This suggests that SlmA-mediated cell division delay is important for faithful chromosome processing in absence of MatP. SlmA certainly delays division until non-*ter* regions are excluded from the division plane. We suspect that septum closure over non-*ter* regions leads to higher frequencies of DNA damages than septum closing over *ter* regions, which resembles the normal situation.

An equivalent synergistic effect between MatP and SlmA inactivation was found for sensitivity to topoisomerase inhibitors. We previously reported that $\Delta(matP)$ strains display a higher sensitivity than wt to type II topoisomerase inhibitors (Sayyed et al., 2016). This involves higher requirement for TopoIV activity in $\Delta(matP)$ compared to wt strains for decatenation of sister chromosomes (Nolivos et al., 2016; Sayyed et al., 2016). The $\Delta(slmA)$ strain was also slightly more sensitive than wt to novobiocin (Figure 6B). This suggests a higher requirement for coupling chromosome segregation with cell division when chromosome management is rendered more difficult by partial inhibition of type II topoisomerases. The sensitivity of the $\Delta(matP) \Delta(slmA)$ strain was largely enhanced compared to both single

Fig. S2

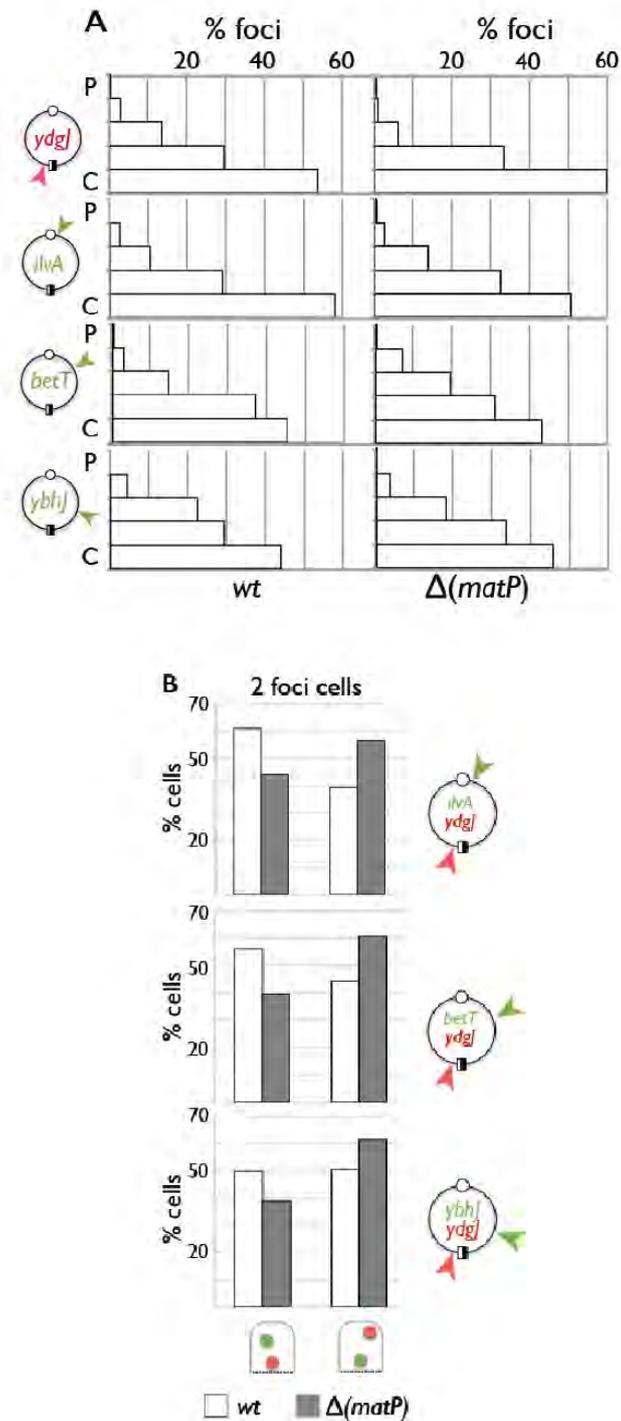


Figure S2 : Effect of MatP on chromosome orientation in two foci cells.

Inset maps show the loci tagged with *parSpMT1* (red) or *parSP1* (green). Names of tagged loci are indicated as well as the replication origin (open circle) and the *dif* site (black and white square). Only cells harbouring single foci (one of each colour) are shown. A) Foci were binned into five categories depending on their position on the long cell axis (x-axis; C: cell centre; P: cell pole). The percentage of foci in each category is shown for wt (left) and $\Delta(matP)$ (right) strains (y-axis). B) Cells were binned into two categories depending on which focus is closest from mid-cell (x-axis). Left panels show the percentage of cells in each category (y-axis) for cells with three foci and right panels for cells with four foci. Open bars: wt cells; grey bars: $\Delta(matP)$ cells.

mutants. This again points to a special role for SlmA-mediated coupling between chromosome segregation and cell division when segregation is delayed and/or inhibited. Taken together, these results show that MatP, SlmA and their interplay are important for chromosome management in *E. coli*.

Fig. S3

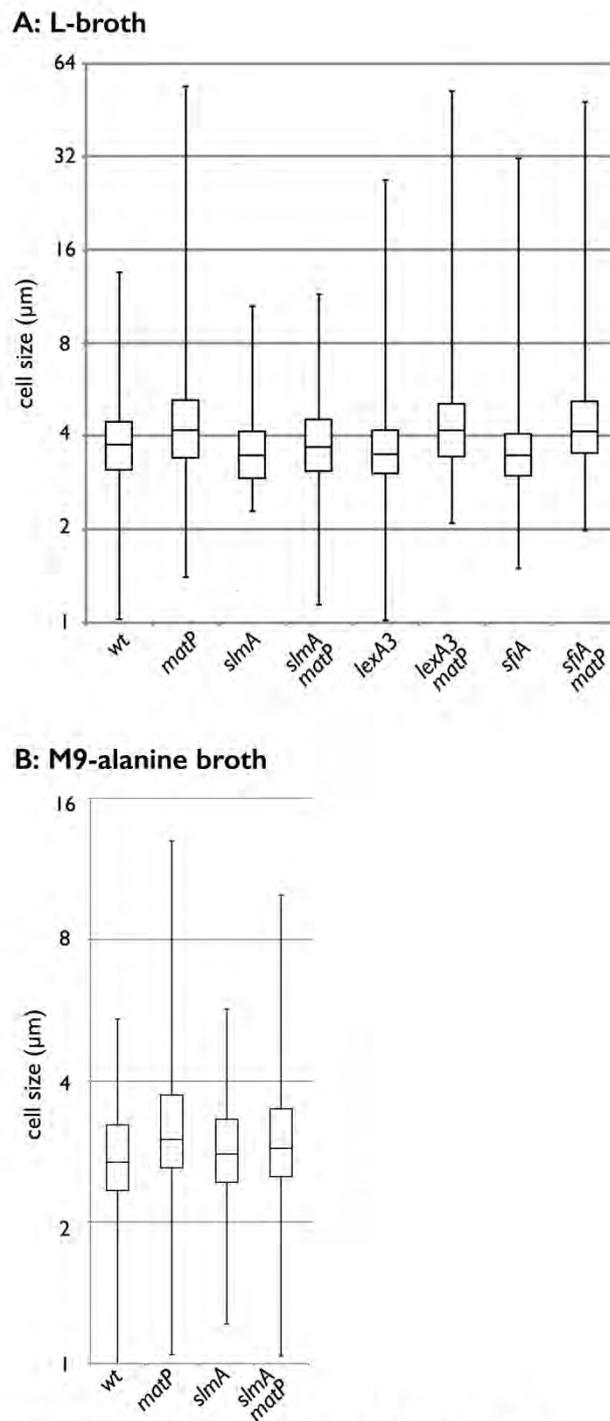


Figure S3 : SlmA inactivation suppresses division defects in $\Delta(matP)$ cells.

Cell size distribution of strain carrying the indicated mutation (x-axis) in the two different indicated growth conditions. Medians with quartiles are shown.

Conclusion

The most striking result reported here is the role of MatP, a protein specifically acting in the *ter* region, in global chromosome orientation. Clearly, chromosome orientation is lost in pre-divisional cells when MatP is inactivated. A direct consequence is inhibition of cell division mediated by miss-positioned DNA-bound SlmA proteins. In other bacteria, chromosome orientation has been reported to depend on ParABS systems, acting in the replication origin region. These systems promote the loading of SMC complexes acting to align the two chromosome arms and to maintain chromosome orientation (David et al., 2014; Le et al., 2013; Marbouty et al., 2015; Wang et al., 2015). *E. coli* and related bacteria lack chromosomal ParABS systems. Our results strongly suggest that *E. coli* chromosome orientation is primarily controlled from the *ter* region. It was recently reported that MatP excludes the *E. coli* SMC complex, MukBEF, from the *ter* region. This is proposed to control MukBEF loading over the entire chromosome (Nolivos et al., 2016). Our results are fully consistent with this view. MatP may also exclude the non-*ter* regions from mid-cell via its self-interacting and/or ZapB-interacting activities, for example by creating a steric hindrance due to folding of the Ter-macrodomain at mid-cell (Dupaigne et al., 2012; Espéli et al., 2012). Deciphering between these hypotheses will require isolating clear separation-of-function mutations in *matP*.

Fig. S4

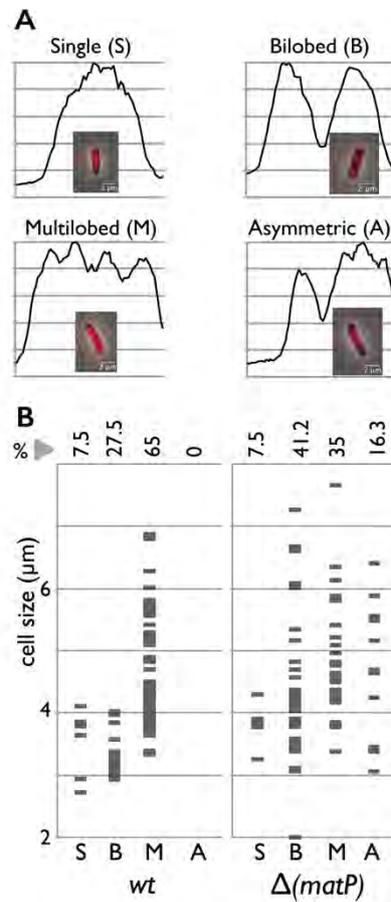


Figure S4 : MatP controls nucleoid positioning.

A) Examples of localisations of a HU-mCherry fusion protein (Methods) representative of the four categories indicated on the top of the graphs. Each graph shows a line scan of fluorescence from the cell shown in insets. X-axis: pixels; y-axis: fluorescence normalized to the most intense pixel (from 0, bottom line, to 100%, top line).

B) Repartition of the four categories of nucleoid shapes (x-axis) as a function of cell length (y-axis). The percentage of each category is given on the top of the graphs. Left: wt cells; right: $\Delta(\text{matP})$ cells.

Materials and Methods

Strains and plasmids.

Strains used were derived from *E. coli* K12 strain LN2666 (W1485 F^- *leu thyA thi deoB or C supE rpsL* (StR); (38)) and are listed table S1. Plasmids used are listed table S2. Chromosome loci tagged are listed in table S3.

Cell imaging.

Cells were grown at 30°C in LB medium or in M9 medium containing Alanine as carbon source (0,2%) ; thiamine (2µg/ml) ; thymine (20µg/ml) and leucine (20µg/ml). 12h cultures in LB medium or 48h cultures in M9 medium were diluted 150 times in fresh media and growth to $OD_{600}=0.4$ before microscope slides mounting. IPTG (200µM) was eventually added 1h before mounting. Cells, after possible washing in M9 1x, were applied to a 1% agarose slide and places in the microscope temperature controlled box at 30°C before observation on an inverted microscope Ti-E/B (Nikon®) carrying a 100x Plan APO oil-immersion lens (N.A. of 1.45), with a LED light source (Lumencor®) and an Neo sCMOS (Andor®) camera. Images were acquired were using NIS Elements AR 4.4 (Nikon®) software and were converted for semi-automatic analysis with MicrobeTracker and SpotFinderM and manual analysis with ImageJ.

Acknowledgments

We thank Jean-Yves Bouet and the members of our team for critical reading and helpful discussions. We thank the NBRP-*E.coli* at NIG for the gift of strains.

This work was funded by the CNRS, University Paul Sabatier, ANR contract 10-BLAN-1327 and 14-CE10-0007, the FEDER Midi-Pyrénées and the ARC. EL was supported by a fellowship from the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche.

Table S1

Strain	Relevant Genotype	Comments	References
<u>Reference Strains</u>			
LN2666	W1485 W1485 F- leu thyA thi deoB or C supE rpsI (StR)	Wild-type Strain	Cornet et al., 1996
MS112	LN2666 del(lacZ) :: gfp-parBP1		Stouf et al., 2013
<u>Strains with deletion for phenotype analysis</u>			
MS191	MS112 matP :: FRT-	Transfert of matP::Frt-Cm-Frt from RM1 (1) ¹	Lab collection
EL1	LN2666 slmA :: Frt-	Transfert of slmA::FRT-Kn-FRT from JW5641 of the KEIO collection (2) ^{1,2}	This work
MS298	MS191 slmA :: FRT-Tc-FRT	Transfert of slmA::FRT-Tc-FRT from CP78 ^{1,2}	Lab collection
EL301	MS112 lexA1 (Ind-) male :: Tn10 (Tc)	Transfert of lexA1 (Ind-) male :: Tn10 (Tc) from FC287 ¹	This work
EL303	MS191 lexA1 (Ind-) male :: Tn10 (Tc)	Transfert of lexA1 (Ind-) male :: Tn10 (Tc) from FC287 ¹	This work
LP21	LN2666 zapB :: FRT-Kn-FRT	Transfert of zapB :: FRT-Kn-FRT from JW3899 of the KEIO collection (2) ¹	This work
LP23	LN2666 zapB :: FRT-Kn-FRT slmA :: FRT-Tc-FRT	Transfert of zapB :: FRT-Kn-FRT from JW3899 of the KEIO collection (2) ¹ and slmA::FRT-Tc-FRT from CP78 ¹	This work
LP24	LN2666 matP :: FRT-Cm-FRT zapB :: FRT-Kn-FRT	Transfert of matP::Frt-Cm-Frt from RM1 (1) ¹ and zapB :: FRT-Kn-FRT from JW3899 of the KEIO collection (2) ¹	This work
LP26	LN2666 matP :: FRT-Cm-FRT zapB :: FRT-Kn-FRT slmA :: FRT-Tc-FRT	Transfert of matP::Frt-Cm-Frt from RM1 (1) ¹ , zapB :: FRT-Kn-FRT from JW3899 of the KEIO collection (2) ¹ and slmA::FRT-Tc-FRT from CP78 ¹	This work
<u>Strains for nucleoid visualization</u>			
CP1051	LN2666 hupA-mCherry-Kn	Transfert of hupA-mCherry-Kn from SJ159 (3) ¹	
CP1028	LN2666 matP :: Frt- Cm-FRT hupA-mCherry-Kn	Transfert of matP::Frt-Cm-Frt from RM1 (1) ¹ and hupA-mCherry-Kn from SJ159 (3) ¹	Lab collection
EL444	LN2666 slmA :: Frt-Kn-FRT+pTB72	Transfert of slmA::FRT-Kn-FRT from JW5641 of the KEIO collection (2) ¹	This work
EL445	LN2666 slmA :: FRT-Kn-FRT matP :: FRT- + pTB72	Transfert of slmA::FRT-Kn-FRT from JW5641 of the KEIO collection (2) ¹ and matP::Frt-Cm-Frt from RM1 (1) ^{1,2}	This work
<u>Single-locus tagged strains</u>			
MS15	LN2666 inter(ydgJ,ydgT) :: parSpMT1-FRT-Cm-FRT	Integration of parS pMT1 at the ydgJ-ydgT locus using λRed Recombination ⁴	Stouf et al., 2013
EL14	MS112 inter(betT,yahA) :: parSp1-IR-Kn-IR	Integration of parSp1-IR-Kn-IR at the betT-yahA locus using pEL20 ³	This Work

EL15	MS191 inter(betT,yahA) :: parSp1-IR-Kn-IR	Integration of parSp1-IR-Kn-IR at the betT-yahA locus using pEL20 ³	This Work
MS158	MS112 inter(ilvA;ilvY) :: parS P1-IR-Kn-IR	Integration of parSp1-IR-Kn-IR at the ilvA-ilvY locus using pMS59 ³	Stouf et al., 2013
MS192	MS191 inter(ilvA;ilvY) :: parS P1-IR-Kn-IR	Integration of parSp1-IR-Kn-IR at the ilvA-ilvY locus using pMS59 ³	Lab collection
MS182	MS112 inter(ybhC,ybhJ) :: parS P1-IR-Kn-IR	Integration of parSp1-IR-Kn-IR at the ybhC-ybhJ locus using pMS58 ³	Stouf et al., 2013
MS216	MS191 inter(ybhC,ybhJ) :: parS P1-IR-Kn-IR	Integration of parSp1-IR-Kn-IR at the ybhC-ybhJ locus using pMS58 ³	Lab collection

Double-loci tagged strains

EL318	MS112 inter(betT,yahA) :: parSp1-IR-Kn-IR inter(ydgJ,ydgT) :: parSpMT1-FRT-Cm-FRT + pLP9	Transfert of parSpMT1-FRT-Cm-FRT from MS15 in EL14 ¹ Transformation with pLP9	This Work
EL319	MS191 inter(betT,yahA) :: parSp1-IR-Kn-IR inter(ydgJ,ydgT) :: parSpMT1-FRT-Cm-FRT + pLP9	Transfert of parSpMT1-FRT-Cm-FRT from MS15 in EL14 ¹ Transformation with pLP9	This Work
EL320	MS112 inter(ilvA,ilvY) :: parSp1-IR-Kn-IR inter(ydgJ,ydgT) :: parSpMT1-FRT-Cm-FRT + pLP9	Transfert of parSpMT1-FRT-Cm-FRT from MS15 in MS158 ¹ Transformation with pLP9	This Work
EL321	MS191 inter(ilvA,ilvY) :: parSp1-IR-Kn-IR inter(ydgJ,ydgT) :: parSpMT1-FRT-Cm-FRT + pLP9	Transfert of parSpMT1-FRT-Cm-FRT from MS15 in MS192 ¹ Transformation with pLP9	This Work
EL373	MS112 inter(ybhC,ybhJ) :: parSp1-IR-Kn-IR inter(ydgJ,ydgT) :: parSpMT1-FRT-Cm-FRT + pLP9	Transfert of parSpMT1-FRT-Cm-FRT from MS15 in MS182 ¹ Transformation with pLP9	This Work
EL350	MS191 inter(ybhC,ybhJ) :: parSp1-IR-Kn-IR inter(ydgJ,ydgT) :: parSpMT1-FRT-Cm-FRT + pLP9	Transfert of parSpMT1-FRT-Cm-FRT from MS15 in MS216 ¹ Transformation with pLP9	This Work

St, streptomycin resistance determinant ; Kn, kanamycin resistance determinant ; Cm, chloramphenicol resistance determinant ; Tc, tetracyclin resistance determinant ; Amp, Ampicillin resistance determinant

¹ Constructs tagged by resistance determinants were transferred by P1 transduction following standard procedures

² Cassettes were first inserted or transferred into relevant strains, and then the Cm determinant was deleted using plasmid pCP20 (Datsenko and Wanner, 2000)

³ Transgenesis using plasmids of the pLN135 family used an integration-excision procedure (Cornet et al., 1996)

⁴ Red-mediated transgenesis was done in strain DY378 following standard procedures (Yu et al., 2000) and then were transferred to relevant strains by P1 transduction.

- (1) Mercier et al., 2008
- (2) Baba et al., 2006
- (3) Peletier et al., 2012

Table S2

Plasmid	Relevant genotype	Reference
pTB72	pLac :: gfp-sImA Amp	Bernhardt and De Boer, 2005
pFC241	pGB2 pBAD :: xerC Amp	Nolivos et al., 2010
pMS7	pLN135 with an engineered lacI–lacY region deleted for lacZ	Stouf et al., 2013
pMS11	pMS7 with mCherry-parBpMT1	Stouf et al., 2013
pLP9	pMS11 with Amp	This Work
pMS74	pLN135 with an engineered betT-yahA locus	Stouf et al., 2013
pEL20	pMS74 with parSp1-IR-Kn-IR	This Work

References

- Bates, D., and Kleckner, N. (2005). Chromosome and Replisome Dynamics in *E. coli*: Loss of Sister Cohesion Triggers Global Chromosome Movement and Mediates Chromosome Segregation. *Cell* *121*, 899–911.
- Bernhardt, T.G., and de Boer, P.A.J. (2005). SlmA, a nucleoid-associated, FtsZ binding protein required for blocking septal ring assembly over Chromosomes in *E. coli*. *Mol. Cell* *18*, 555–564.
- Cho, H., and Bernhardt, T.G. (2013). Identification of the SlmA active site responsible for blocking bacterial cytokinetic ring assembly over the chromosome. *PLoS Genet.* *9*, e1003304.
- Cho, H., McManus, H.R., Dove, S.L., and Bernhardt, T.G. (2011). Nucleoid occlusion factor SlmA is a DNA-activated FtsZ polymerization antagonist. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *108*, 3773–3778.
- David, A., Demarre, G., Muresan, L., Paly, E., Barre, F.-X., and Possoz, C. (2014). The Two Cis-Acting Sites, parS1 and oriC1, Contribute to the Longitudinal Organisation of *Vibrio cholerae* Chromosome I. *PLoS Genet.* *10*.
- Deghorain, M., Pagès, C., Meile, J.-C., Stouf, M., Capiaux, H., Mercier, R., Lesterlin, C., Hallet, B., and Cornet, F. (2011). A defined terminal region of the *E. coli* chromosome shows late segregation and high FtsK activity. *PLoS One* *6*, e22164.
- Du, S., and Lutkenhaus, J. (2014). SlmA antagonism of FtsZ assembly employs a two-pronged mechanism like MinCD. *PLoS Genet.* *10*, e1004460.
- Dupaigne, P., Tonthat, N.K., Espéli, O., Whitfill, T., Boccard, F., and Schumacher, M.A. (2012). Molecular Basis for a Protein-Mediated DNA-Bridging Mechanism that Functions in Condensation of the *E. coli* Chromosome. *Mol. Cell* *48*, 560–571.
- Espeli, O., Mercier, R., and Boccard, F. (2008). DNA dynamics vary according to macrodomain topography in the *E. coli* chromosome. *Mol. Microbiol.* *68*, 1418–1427.
- Espéli, O., Borne, R., Dupaigne, P., Thiel, A., Gigant, E., Mercier, R., and Boccard, F. (2012). A MatP–divisome interaction coordinates chromosome segregation with cell division in *E. coli*. *EMBO J.* *31*, 3198–3211.
- Hendricks, E.C., Szerlong, H., Hill, T., and Kuempel, P. (2000). Cell division, guillotining of dimer chromosomes and SOS induction in resolution mutants (*dif*, *xerC* and *xerD*) of *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* *36*, 973–981.

- Kleckner, N., Fisher, J.K., Stouf, M., White, M.A., Bates, D., and Witz, G. (2014). The Bacterial Nucleoid: Nature, Dynamics and Sister Segregation. *Curr. Opin. Microbiol.* 22, 127–137.
- Le, T.B.K., Imakaev, M.V., Mirny, L.A., and Laub, M.T. (2013). High-resolution mapping of the spatial organization of a bacterial chromosome. *Science* 342, 731–734.
- Männik, J., Castillo, D.E., Yang, D., Siopsis, G., and Männik, J. (2016). The role of MatP, ZapA and ZapB in chromosomal organization and dynamics in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res.*
- Marbouty, M., Le Gall, A., Cattoni, D.I., Cournac, A., Koh, A., Fiche, J.-B., Mozziconacci, J., Murray, H., Koszul, R., and Nollmann, M. (2015). Condensin- and Replication-Mediated Bacterial Chromosome Folding and Origin Condensation Revealed by Hi-C and Super-resolution Imaging. *Mol. Cell* 59, 588–602.
- Marceau, A.H., Bahng, S., Massoni, S.C., George, N.P., Sandler, S.J., Mariani, K.J., and Keck, J.L. (2011). Structure of the SSB–DNA polymerase III interface and its role in DNA replication. *EMBO J.* 30, 4236–4247.
- Mercier, R., Petit, M.-A., Schbath, S., Robin, S., El Karoui, M., Boccard, F., and Espéli, O. (2008). The MatP/matS Site-Specific System Organizes the Terminus Region of the *E. coli* Chromosome into a Macrodomain. *Cell* 135, 475–485.
- Monahan, L.G., Liew, A.T.F., Bottomley, A.L., and Harry, E.J. (2014). Division site positioning in bacteria: one size does not fit all. *Front. Microbiol.* 5.
- Nielsen, H.J., Ottesen, J.R., Youngren, B., Austin, S.J., and Hansen, F.G. (2006). The *Escherichia coli* chromosome is organized with the left and right chromosome arms in separate cell halves. *Mol. Microbiol.* 62, 331–338.
- Nolivos, S., Upton, A.L., Badrinarayanan, A., Müller, J., Zawadzka, K., Wiktor, J., Gill, A., Arciszewska, L., Nicolas, E., and Sherratt, D. (2016). MatP regulates the coordinated action of topoisomerase IV and MukBEF in chromosome segregation. *Nat. Commun.* 7, 10466.
- Rico, A.I., Krupka, M., and Vicente, M. (2013). In the Beginning, *Escherichia coli* Assembled the Proto-ring: An Initial Phase of Division. *J. Biol. Chem.* 288, 20830–20836.
- Sayed, H.E., Chat, L.L., Lebailly, E., Vickridge, E., Pages, C., Cornet, F., Lagomarsino, M.C., and Espéli, O. (2016). Mapping Topoisomerase IV Binding and Activity Sites on the *E. coli* Genome. *PLOS Genet* 12, e1006025.
- Stouf, M., Meile, J.-C., and Cornet, F. (2013). FtsK actively segregates sister chromosomes in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, 11157–11162.

Tonthat, N.K., Arold, S.T., Pickering, B.F., Van Dyke, M.W., Liang, S., Lu, Y., Beuria, T.K., Margolin, W., and Schumacher, M.A. (2011). Molecular mechanism by which the nucleoid occlusion factor, SImA, keeps cytokinesis in check. *EMBO J.* *30*, 154–164.

Tonthat, N.K., Milam, S.L., Chinnam, N., Whitfill, T., Margolin, W., and Schumacher, M.A. (2013). SImA forms a higher-order structure on DNA that inhibits cytokinetic Z-ring formation over the nucleoid. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *110*, 10586–10591.

Tsang, M.-J., and Bernhardt, T.G. (2015). Guiding divisome assembly and controlling its activity. *Curr. Opin. Microbiol.* *24*, 60–65.

Wang, X., Llopis, P.M., and Rudner, D.Z. (2013). Organization and segregation of bacterial chromosomes. *Nat. Rev. Genet.* *14*, 191–203.

Wang, X., Le, T.B.K., Lajoie, B.R., Dekker, J., Laub, M.T., and Rudner, D.Z. (2015). Condensin promotes the juxtaposition of DNA flanking its loading site in *Bacillus subtilis*. *Genes Dev.* *29*, 1661–1675.

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

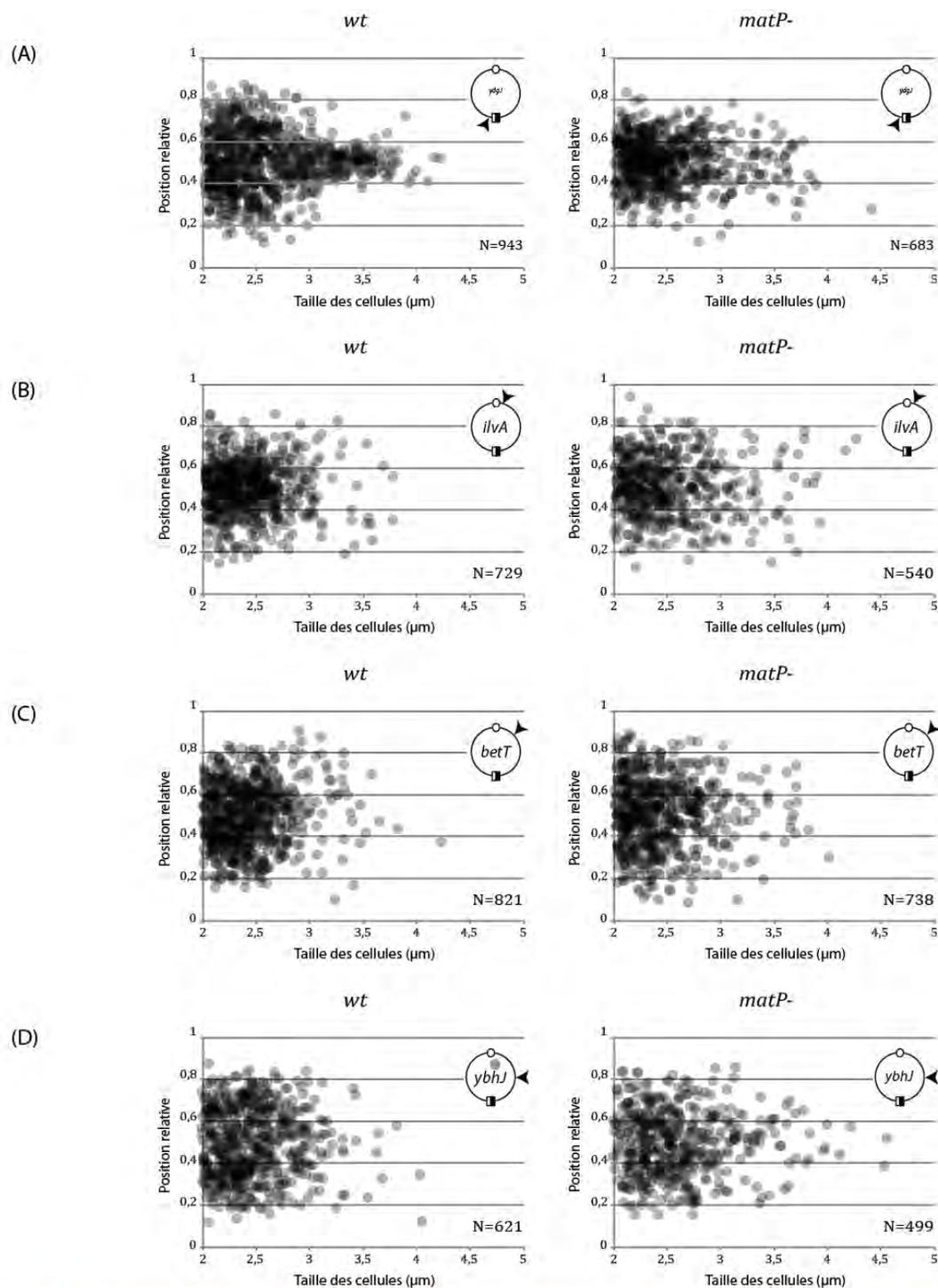


Figure 49 : Position relative des foci dans la longueur, dans les cellules à 1 focus

Représentation de la position des foci dans la longueur en fonction de la taille des cellules, dans une souche sauvage (colonne de gauche) ou dans une souche *matP*⁻ (colonne de droite). La position d'insertion du site *parS* est indiquée en haut à droite sur chaque graphique. Le nombre de foci représenté est indiqué en haut à droite. Les position 0 et 1 correspondent aux pôles de la cellule (pas de distinction faite entre le nouveau pôle et l'ancien pôle). La position 0,5 correspond au centre de la cellule. (A) Le site *parS* est inséré dans la région *ter*, au locus *ydjJ*. (B) Le site *parS* est inséré dans la région Ori, au locus *ilvA*. (C) Le site *parS* est inséré dans la région NS-Right, au locus *betT*. (D) Le site *parS* est inséré dans la région Right, au locus *ybhJ*.

1.3. Résultats complémentaires sur le rôle de MatP dans l'organisation du chromosome et le contrôle de la division cellulaire

1.3.1. L'inactivation de MatP modifie le positionnement intracellulaire des loci dans *ter* et en dehors de *ter*

Dans le manuscrit, les figures 2 et S2 présentent le positionnement dans la longueur de la cellule des loci chromosomiques dans une souche sauvage et dans une souche *matP*⁻, pour les cellules avec un seul foci et pour les cellules avec 2 focus, c'est-à-dire pour les cellules où il y a eu réplication et ségrégation du locus chromosomique marqué par un site *parS*. Ce mode de représentation permet de mettre en évidence un défaut de localisation des loci dans les cellules avec deux foci (= les cellules pré-divisionnelles) en absence de MatP, mais ne permet de voir de réelles différences pour les cellules à 1 focus. De plus, dans cette représentation, la taille de la cellule n'est pas prise en compte, mais uniquement l'état de ségrégation du locus marqué par un *parS*, ce qui ne permet pas d'observer des différences à différentes étapes du cycle cellulaire.

Pour pallier à ce problème de représentation, nous avons représenté la position des foci dans la longueur de la cellule en fonction de la taille de la cellule, sous forme de nuage de points. Le jeu de données est le même que celui utilisé dans le manuscrit. Pour chaque souche, deux nuages de points sont réalisés : l'un représente la position des foci dans les cellules avec un seul focus (Figure 49) et l'autre représente la position des foci dans les cellules avec deux focus (Figure 50). La proportion de cellules avec plus de 2 foci étant très faible quel que soit la souche étudiée (moins de 2% des cellules), la position des foci dans les cellules à plus de 2 foci n'est pas représentée.

Pour le locus marqué dans la région *ter* (Figure 49A gauche), on constate qu'en présence de MatP, dans les cellules avec un seul focus, les foci ont une localisation diffuse dans la cellule, entre la position 0,2 et la position 0,8, dans les cellules de taille inférieure à 3 μ m. Concernant les cellules de taille supérieur à 3 μ m, on note cette fois-ci une localisation préférentielle au centre de la cellule, entre les positions 0,4 et 0,6. Passée la taille de 4 μ m, on constate qu'il y a très peu de points, soit très peu de cellules de cette taille ayant un seul focus.

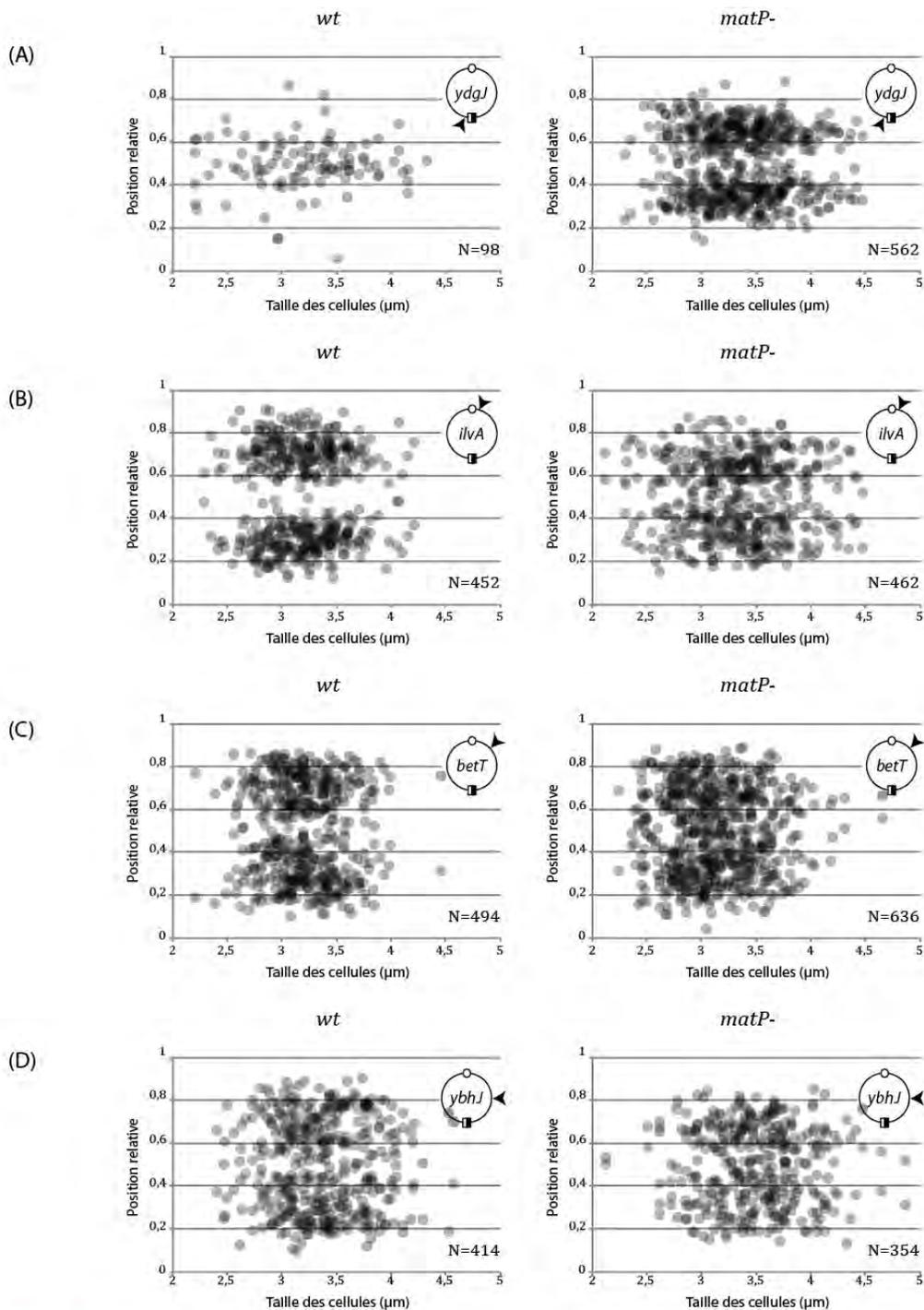


Figure 50 : Position relative des foci dans la longueur, dans les cellules à 2 foci

Représentation de la position des foci dans la longueur en fonction de la taille des cellules, dans une souche sauvage (colonne de gauche) ou dans une souche *matP*⁻ (colonne de droite). La position d'insertion du site *parS* est indiquée en haut à droite sur chaque graphique. Le nombre de foci représenté est indiqué en haut à droite. Les positions 0 et 1 correspondent aux pôles de la cellule (pas de distinction faite entre le nouveau pôle et l'ancien pôle). La position 0,5 correspond au centre de la cellule. (A) Le site *parS* est inséré dans la région *ter*, au locus *ydjJ*. (B) Le site *parS* est inséré dans la région Ori, au locus *ilvA*. (C) Le site *parS* est inséré dans la région NS-Right, au locus *betT*. (D) Le site *parS* est inséré dans la région Right, au locus *ybhJ*.

En l'absence de MatP, toujours pour un locus marqué dans la région *ter* du chromosome dans les cellules avec un seul focus (Figure 49A droite), on observe une localisation plus diffuse du locus dans les cellules de taille supérieure à 3µm, comparé à la souche sauvage, où les loci sont préférentiellement localisés au centre dans les cellules de plus grande taille. De plus, si l'on regarde la densité des points, ainsi que la distribution de taille des cellules avec 1 seul focus (données non présentées), on remarque qu'en absence de MatP, il y a moins de cellules de plus de 3µm avec un seul focus (seulement 10% des cellules à 1 focus ont une taille supérieure à 3µm) qu'en présence de MatP (18% des cellules à 1 focus ont une taille supérieure à 3µm).

Pour les cellules à deux foci, marquées dans la région *ter* du chromosome (Figure 50A), on remarque évidemment en premier une augmentation du nombre de cellules à deux focus, se traduisant par une augmentation du nombre de points sur le nuage de points. Malgré le faible nombre de cellules avec deux focus en présence de MatP, on voit tout de même que la région *ter*, après réplication et ségrégation, reste préférentiellement localisée au centre de la cellule, entre les positions 0,4 et 0,6 (comme on le voit aussi sur la figure 2 du manuscrit). En absence de MatP, on constate une augmentation du nombre de cellules à deux foci, ainsi qu'une perte de la localisation préférentielle au centre de la cellule, signes d'une ségrégation plus précoce de la région terminale du chromosome, comme cela a précédemment été montré (Mercier et al., 2008).

Pour les cellules avec un locus marqué dans la région Ori, et avec 1 seul focus (Figure 49B), la majorité des foci sont localisés entre la position 0,4 et 0,6 dans les cellules de taille inférieure à 2,8µm. En absence de MatP, on constate toujours aussi cette plus forte densité entre la position 0,4 et 0,6, mais de façon moins prononcée. Pour les cellules avec un locus marqué dans la région NS-Right ou Right (Figure 49C et D), le même type de constat est fait. Même si les différences entre les souches sauvages et les souches *matP*⁻ ne sont pas très prononcées, pour les souches avec un locus marqué en dehors de *ter*, on constate tout de même que l'absence de MatP a des conséquences sur la localisation des régions chromosomiques autre que la région *ter*, avant la réplication et la ségrégation de ces régions.

Pour les cellules avec 2 foci cette fois-ci, la différence de localisation des foci pour les souches avec un locus marqué dans Ori, NS-Right ou Right (Figure 50B, C et D) est plus frappante ; en particulier pour la souche avec un locus marqué dans la région Ori. Les nuages de points, comme les histogrammes présentés dans le manuscrit (figure 2 du manuscrit), permettent de mettre en évidence un changement de localisation des loci en dehors de *ter*, après réplication et ségrégation, en absence de MatP. Alors qu'en présence de MatP, peu de foci sont localisés au centre de la cellule, entre les positions 0,4 et 0,6 (8% pour la souche marquée dans Ori, 16% pour la souche marquée dans NS-Right et 21% pour la souche marquée dans Right), on constate une présence plus fréquente des foci au centre de la cellule en absence de MatP, avec un pourcentage similaire quelle que soit la position marquée (aux alentours de 27% des foci entre les positions 0,4 et 0,6). Sur les nuages de points, on observe une zone quasi dépourvue de foci au centre de la cellule, quelle que soit la taille des cellules. Cette zone est plus grande pour la souche marquée dans Ori que pour la souche marquée dans Right, ce qui est consistant avec le fait qu'après réplication et ségrégation, la région Ori migre aux positions 0,25 et 0,75 de la cellule, et les régions Right et Left sont localisées entre les régions Ori et la région terminale du chromosome, localisée quant à elle au centre de la cellule (voir partie 2.5.2). En absence de MatP, cette zone disparaît, et on ne constate plus de différence entre les différents loci marqués. Quelle que soit leur distance de la région *ter*, ils ont une même probabilité de présence au centre de la cellule.

Ces résultats complémentaires confirment le fait que MatP est impliquée dans le positionnement global du chromosome, et pas uniquement dans le positionnement de la région *ter* du chromosome, via l'exclusion des régions autres que la région *ter* du centre de la cellule.

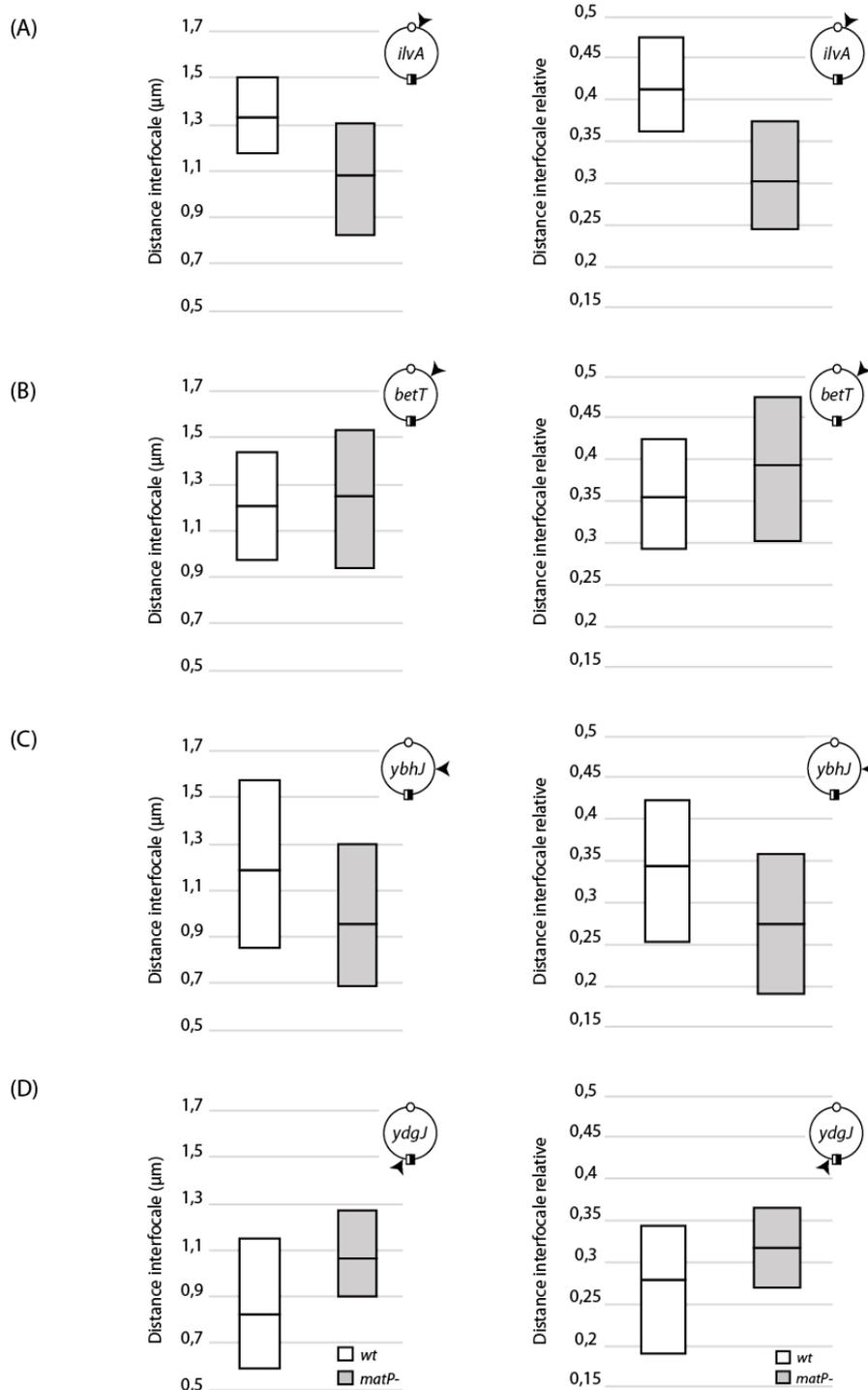


Figure 51 : Comparaison des distances interfocales entre foci frères

A gauche, graphique des distances interfocales en μm entre deux foci frères, dans une souche sauvage (rectangle blanc) ou dans une souche *matP*⁻ (rectangle grisé). A droite, graphique des distances interfocales relatives (= distance interfocale en μm /longueur de la cellule) entre deux foci frères, dans une souche sauvage (rectangle blanc) ou dans une souche *matP*⁻ (rectangle grisé). Seuls le 1^e quartile, la médiane et le 3^e quartile sont représentés. La position d'insertion du site *parS* est indiquée en haut à droite sur chaque graphique. (A) Le site *parS* est inséré dans la région Ori, au locus *ilvA*. (B) Le site *parS* est inséré dans la région NS-Right, au locus *betT*. (C) Le site *parS* est inséré dans la région Right, au locus *ybhJ*. (D) Le site *parS* est inséré dans la région *ter*, au locus *ydgJ*.

1.3.2. L'inactivation de MatP modifie la distance interfocale entre foci frères et entre foci non frères

- Distances interfocales entre foci frères

Afin de compléter les résultats ci-dessus, nous avons calculé les distances interfocales entre les foci frères (donc uniquement dans les cellules avec deux foci) (Figure 51 gauche) dans une souche sauvage et dans une souche *matP*⁻. Afin de compenser l'accroissement de taille des cellules en absence de MatP, nous avons aussi calculé les distances interfocales relatives, en divisant la distance interfocale en μm par la taille de la cellule en μm , pour chacune des cellules avec deux foci (Figure 51 droite).

Que l'on regarde la distance interfocale réelle ou la distance interfocale relative, on constate que pour la souche sauvage, la distance interfocale diminue, plus on s'éloigne de la région Ori. Pour les foci dans Ori (Figure 51A), la distance interfocale médiane entre foci frères est de 1,33 μm (0,41 en distance relative), puis de 1,20 μm (0,35 en distance relative) pour les foci dans NS-Right (Figure 51B), de 1,16 μm (0,34 en distance relative) pour les foci dans Right (Figure 51C) et enfin seulement 0,84 μm (0,27 en distance relative) pour les foci dans *ter* (Figure 51D).

En absence de MatP, la corrélation inverse entre la distance interfocale et la distance entre le locus marqué et *oriC* est perdue. En effet, on constate une diminution de la distance interfocale médiane pour les foci dans Ori et Right (1,07 μm soit 0,26 μm de moins pour Ori et 0,95 μm soit 0,24 μm de moins pour Right ; Figures 51A et C), et une augmentation de la distance interfocale pour les foci dans NS-Right et *ter* (1,24 μm soit 0,4 μm de plus pour NS-Right et 1,07 μm soit 23 μm pour *ter* ; Figures 51B et D). La distance interfocale médiane du locus dans NS-Right est, en absence de MatP, plus grande que la distance interfocale médiane du locus dans Ori, alors que le locus dans Ori est plus proche de l'origine de réplication *oriC*. De même la distance interfocale médiane du locus dans *ter* est plus grande que la distance interfocale du locus dans Right, alors que le locus dans *ter* est plus éloigné de l'origine de réplication *oriC* que le locus dans Right.

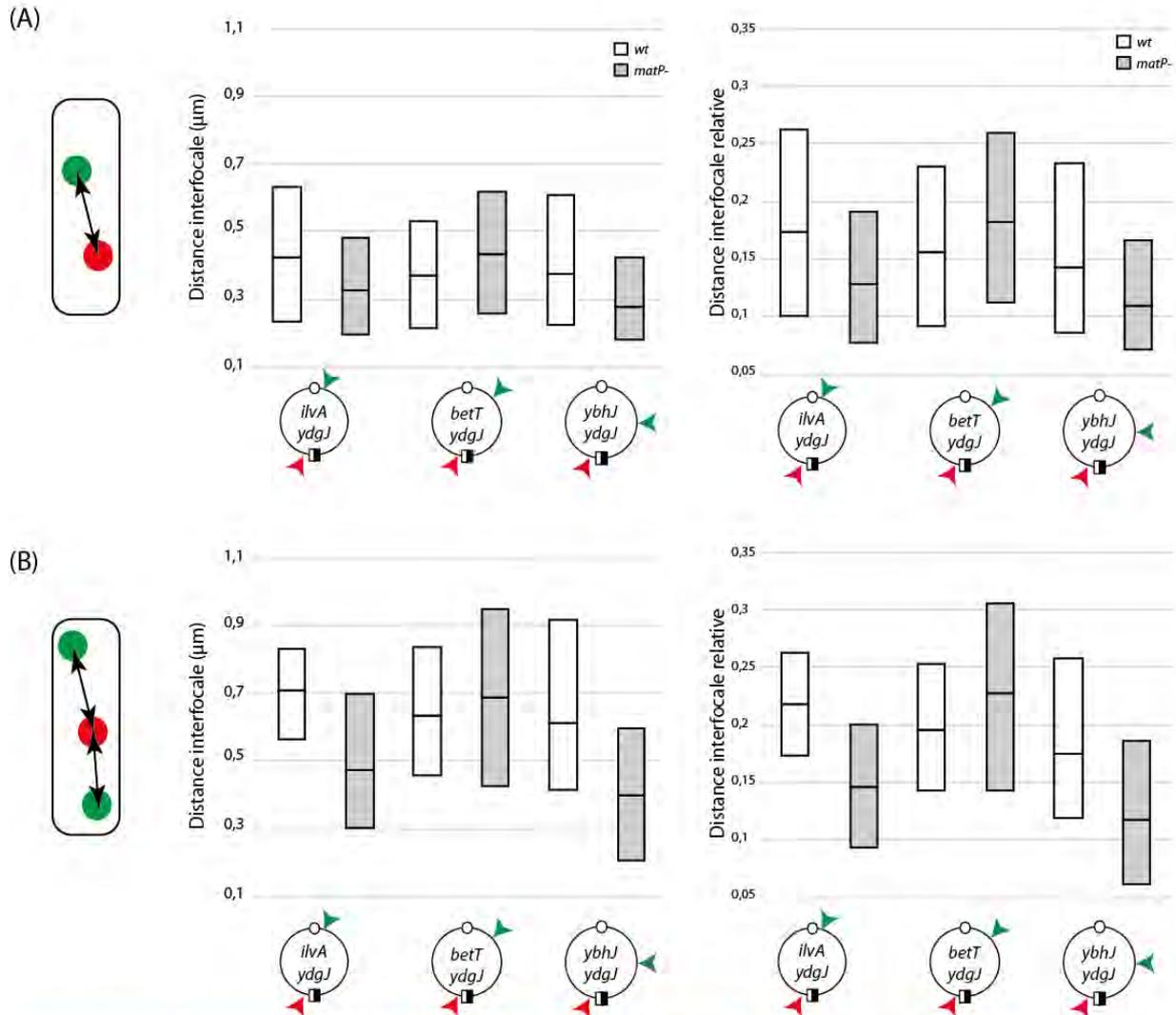


Figure 52 : Comparaison des distances interfocales entre foci non frères

A gauche, graphique des distances interfocales en μm entre deux foci non frères, dans une souche sauvage (rectangle blanc) ou dans une souche *matP*⁻ (rectangle grisé). A droite, graphique des distances interfocales relatives (= distance interfocale en μm /longueur de la cellule) entre deux foci non frères, dans une souche sauvage (rectangle blanc) ou dans une souche *matP*⁻ (rectangle grisé). Seuls le 1^e quartile, la médiane et le 3^e quartile sont représentés. Les positions d'insertion des deux sites *parS* est indiquée en bas de chaque graphique. (A) Représentation des distances interfocales entre foci non frères dans les cellules avec 1 focus mCherry et 1 focus GFP. (B) Représentation des distances interfocales entre foci non frères dans les cellules avec 1 focus mCherry et 2 foci GFP.

Concernant le locus dans *ter* (Figure 51D), l'augmentation de la distance interfocale médiane en absence de MatP est cohérente avec le fait que MatP est impliquée dans la compaction, la cohésion et la localisation de la région terminale du chromosome (voir partie 3.1.3). L'absence de MatP provoque une ségrégation précoce de la région *ter*, qui n'est plus maintenue au centre de la cellule par les interactions MatP-ZapB, et qui n'est plus compactée par les interactions MatP-MatP. Les deux loci frères sont donc logiquement plus éloignés l'un de l'autre dans la cellule, et cela n'est pas dû uniquement à un allongement des cellules en absence de MatP, vu que la distance interfocale relative est, elle aussi, augmentée en absence de MatP.

Les distances interfocales médianes des locus dans Ori et Right (Figures 51A et C) sont, quant à elles, diminuées en absence de MatP. La diminution de la distance interfocale est cohérente avec le fait, qu'en absence de MatP, dans les cellules à 2 foci, les foci ont une position plus centrale qu'en présence de MatP. Les foci sont donc moins éloignés les uns des autres, ce qui explique la diminution de la distance interfocale médiane.

Concernant la distance interfocale médiane du locus dans NS-Right (Figure 51B), l'augmentation de la valeur en absence de MatP est faible comparée au changement que l'on observe pour les autres positions. La région NS-Right est décrite comme une région moins structurées et dont le positionnement dans la cellule au cours des différentes étapes du cycle cellulaire est moins précis que pour le reste du chromosome. Cette région ayant déjà un positionnement moins précis dans la cellule, l'absence de MatP a donc moins de conséquences sur cette région que sur le reste du chromosome.

- Distances interfocales entre foci non frères

Toujours sur le même principe, nous avons cette fois-ci calculé les distances interfocales, réelles et relatives, entre foci non frères, dans les cellules avec 1 focus GFP et 1 focus mCherry (Figure 52A) ainsi que dans les souches avec 2 foci GFP et 1 seul focus mCherry (Figure 52B). Pour chaque souche, la région terminale du chromosome a été marquée avec un site *parSpMT1* (reconnu par *parBpMT1*-mCherry), et une autre région (Ori, NS-Right ou Right) a été marquée avec un site *parSp1* (reconnu par *parBp1*-GFP).

Que l'on regarde les cellules n'ayant répliqué ni ségrégué aucun des deux loci marqués (les cellules avec 1 focus GFP et 1 focus mCherry) ou les cellules ayant répliqué et ségrégué le locus marqué avec le *parSp1* mais pas le locus dans la région *ter*, marqué avec le *parSpMT1* (les cellules avec 2 foci GFP et 1 seul focus mCherry), on constate que les distances interfocales réelles et relatives diminuent lorsque la distance génétique entre les deux loci marqués diminue (Figure 52). Cette corrélation entre distance interfocale entre loci non frères et distance génétique est normale, compte tenu de l'orientation *Left-Ori-Right* du chromosome dans les cellules nouvellement nées (et donc dans les cellules n'ayant qu'1 focus GFP et 1 focus mCherry) et de l'orientation *Left-Right-Ter-Left-Right* dans les cellules pré-divisionnelles, où seule la région *ter* n'est pas encore ségréguée (Figure 29).

En absence de MatP, quelle que soit la catégorie de cellules que l'on observe, on constate une diminution de la distance interfocale (aussi bien réelle que relative) entre les foci dans Ori et dans *ter* et entre les foci dans Right et dans *ter*. A l'inverse, on observe une légère augmentation de la distance interfocale entre les loci dans NS-Right et dans *ter*. Ceci indique, qu'en absence de MatP, les régions Ori, Right et Ter sont plus proches les unes des autres dans au moins une partie des cellules. Cela semble logique puisqu'en absence de MatP, les régions Ori ou les régions Right répliquées sont plus proches l'une de l'autre (diminution de la distance interfocale médiane entre loci frères ; Figure 51) et aussi plus souvent localisées dans la région centrale de la cellule (Figure 50).

Concernant la distance interfocale médiane entre le ou les foci dans NS-Right et le focus dans *ter*, on observe une légère augmentation en absence de MatP. Compte tenu du fait que la distance interfocale médiane entre deux foci dans NS-Right après répllication augmente un petit peu (Figure 51B), et que la région terminale du chromosome, avant répllication et ségréguation (cellules à 1 focus), reste plutôt localisée au centre de la cellule, même en absence de MatP (Figure 49), il est normal que la distance interfocale médiane entre ces deux régions augmente très légèrement.

Pour conclure, en l'absence de MatP, les loci frères dans les régions Ori et Right nouvellement répliquées sont plus proches les uns des autres, et ils sont aussi plus proches des loci dans la région *ter*, lorsque celle-ci n'est pas encore ségréguée.

1.4. Résultats préliminaires sur les conséquences du déplacement d'un site *matS* en dehors de la région *ter*

Les résultats qui suivent ne sont que des résultats préliminaires, les expériences n'ayant été réalisées qu'une seule fois. Cependant, les résultats obtenus sont assez intéressants, et surprenants pour être présentés dans ce manuscrit.

Nous savons que MatP est nécessaire à la localisation de la région terminale du chromosome au centre de la cellule, à la fin du cycle cellulaire, mais aussi à la compaction de la région *ter*, ainsi qu'au retard de ségrégation de cette région. Nous nous sommes donc demandé s'il était possible, en déplaçant 1 ou plusieurs sites *matS*, de changer le comportement d'une autre région du chromosome. Nous avons donc choisi d'insérer, dans Ori, NS-Right ou Right, 1 ou 2 sites *matS*, dans les souches possédant un site *parSp1* dans Ori, NS-Right ou Right et un site *parSpMT1* dans *ter*. Le ou les sites *matS* ont été insérés à 10 Kb du site *parSp1* existant. A cette distance, on peut considérer que la ségrégation et la localisation du site *parSp1* reflète la ségrégation et la localisation du ou des sites *matS* déplacés.

1.4.1. La présence d'un site *matS* en dehors de *ter* provoque un léger retard de division cellulaire

Nous avons tout d'abord souhaité savoir si la présence d'un site *matS* déplacé dans une autre région que la région *ter* avait ou non des conséquences sur la taille des cellules. Pour cela, nous avons comparé la taille des cellules entre une souche sauvage, une souche avec 1 site *matS* inséré dans la région Ori, une souche avec 1 site *matS* inséré dans la région Right, et enfin une souche *matP*⁻. Les souches ont été cultivées en M9 ala (condition lente de croissance). Les résultats sont présentés sous forme de boîte à moustache (sans les moustaches) : les extrémités du rectangle représentent le 1^{er} quartile et le 3^e quartile, et le segment au milieu du rectangle représente la valeur médiane (Figure 53).

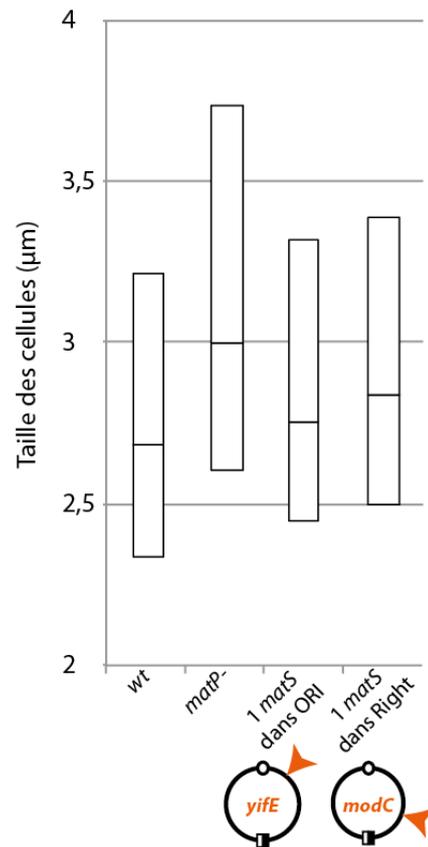


Figure 53 : Phénotype des souches avec 1 site *matS* déplacé en condition de croissance lente

Comparaison de taille des souches sauvage, *matP*-, avec un site *matS* dans la région ORI et avec un site *matS* dans la région Right. Le 1^e quartile, la médiane et le 3^e quartile sont représentés. Le site *matS* dans ORI est inséré au locus *yifE* (carte génomique en haut à droite). Le site *matS* dans Right est inséré au locus *modC* (carte génomique en bas du graphique).

Les résultats concernant la souche sauvage et la souche *matP*⁻ ont déjà été présentés dans le manuscrit (figure 4). En condition de croissance lente, on constate une augmentation de la taille des cellules en absence de MatP (taille médiane de 2,69µm pour une souche sauvage et de 3,01µm pour une souche *matP*⁻), due à un retard de division cellulaire. Nous avons vu précédemment que le retard de division cellulaire étant dépendant de la présence de SlmA, et donc dû au fait qu'en absence de MatP, il y a une perte d'orientation du chromosome, conduisant à la présence, au centre de la cellule, de régions chromosomiques portant des sites SBS, et donc de SlmA, le facteur d'occlusion par le nucléoïde.

Lors de l'insertion d'un seul site *matS*, que ce soit dans la région Ori (locus *yifE*) ou dans la région Right (locus *modC*), toujours en condition de croissance lente, on constate une augmentation de la taille des cellules, comparée à la souche sauvage (Figure 53). Cette augmentation n'est pas aussi importante qu'en absence de MatP (+0,40µm) mais est néanmoins visible sur la représentation graphique (+0,07µm pour la souche avec 1 *matS* dans Ori et +0,14µm pour la souche avec 1 *matS* dans Right). Même si l'augmentation est faible (+2,6% pour la souche avec 1 *matS* dans Ori et +5,2% pour la souche avec 1 *matS* dans Right), il semblerait que l'insertion d'un seul site *matS* en dehors de la région *ter* puisse entraîner un léger retard de division cellulaire. En absence de MatP, l'insertion d'un site *matS* n'a pas de conséquence sur la taille des cellules (données non représentées), on peut donc conclure que l'augmentation de taille des cellules observées lorsque l'on insère un site *matS* en dehors de *ter* est dépendante de la présence de la protéine MatP.

1.4.2. La présence d'un site *matS* en dehors de *ter* modifie le profil de ségrégation des loci situés à proximité

Nous avons ensuite regardé la ségrégation du locus situé à proximité du *matS* déplacé, par rapport à un locus dans la région *ter*, dont on connaît le profil de ségrégation, que ce soit en condition sauvage ou en absence de MatP.

Pour la souche sauvage, on constate que la grande majorité (aux alentours de 70%) des cellules ont 1 focus GFP et 1 focus mCherry, que le *parSp1* soit inséré dans la région Ori (Figure 54A barres blanches) ou dans la région Right (Figure 54B barres blanches).

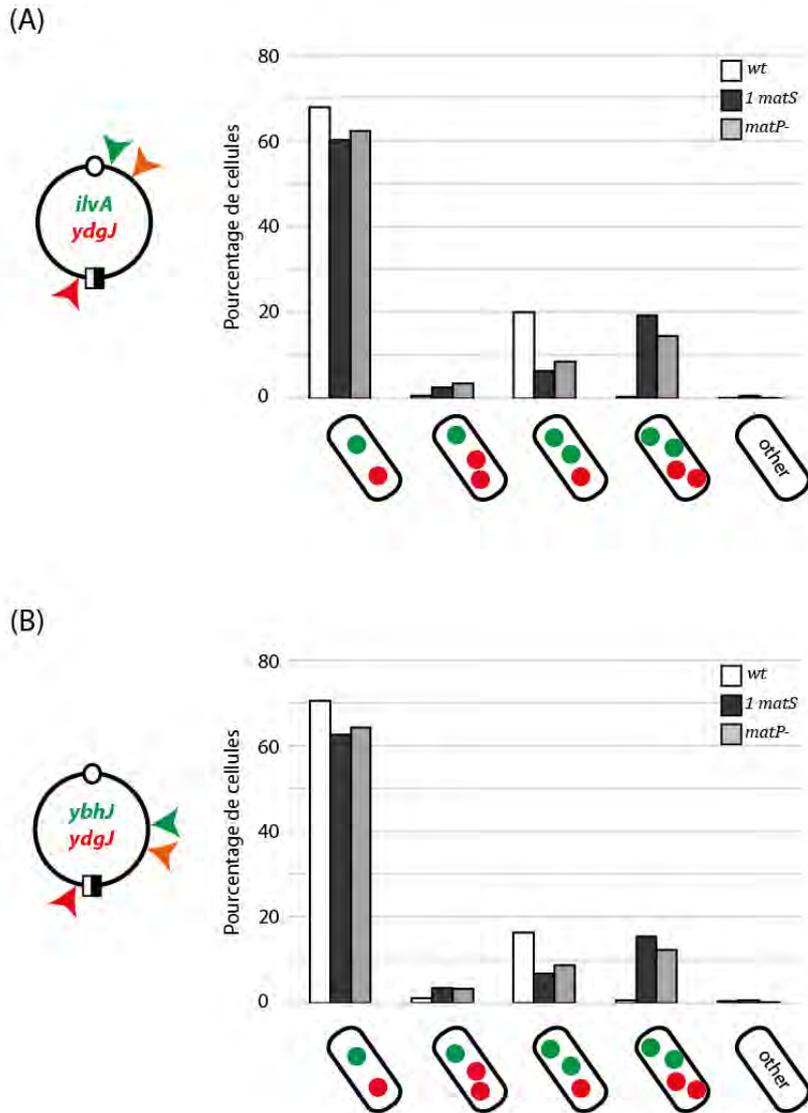


Figure 54 : Pattern de ségrégation du chromosome dans une souche avec 1 site *matS* déplacé

Les cellules sont classées en fonction du nombre de foci GFP et de foci mCherry. Les différentes catégories sont représentées en bas de chaque graphique. La catégorie «other» contient les cellules n'appartenant à aucune autre des quatre catégories. Les positions d'insertion des sites *parSp1* (flèche vert) et *parSpMT1* (flèche rouge) sont indiquées sur la carte génomique à gauche des graphiques. Le site d'insertion du site *matS* est indiqué par une flèche orange. (A) Le site *matS* déplacé a été inséré dans la région Ori, au locus *yifE*, situé à 10Kb environ du locus d'insertion du site *parSp1* (*ilvA*). (B) Le site *matS* déplacé a été inséré dans la région Right, au locus *modC*, situé à 10Kb environ du locus d'insertion du site *parSp1* (*ybhJ*).

L'autre catégorie qui est représenté dans la population est la catégorie avec 2 foci GFP et 1 focus mCherry, ce qui correspond aux cellules qui ont répliqué et ségrégué le locus dans Ori (ou le locus dans Right), mais pas le locus dans *ter* (Figure 54A). En revanche, il n'y a quasi aucune cellule avec 1 seul focus GFP et 2 foci mCherry, indiquant que le focus dans Ori (ou le focus dans Right, Figure 54B) est toujours répliqué avant le focus dans la région *ter*. Il n'y a pas non plus de cellules avec 2 foci GFP et 2 foci mCherry, ce qui indique que la ségrégation de la région *ter* intervient en toute fin du cycle cellulaire, et que la séparation des deux loci n'est pas assez importante avant la fin de la septation pour réussir à visualiser deux foci individualisés en microscopie optique.

En absence de MatP (Figure 54 barres grises), on observe une diminution du nombre de cellules appartenant à la catégorie 1 focus GFP et 1 focus mCherry ainsi qu'à la catégorie 2 foci GFP et 1 focus mCherry (les deux catégories les plus représentées en condition sauvage) au profit de la catégorie 2 foci GFP et 2 foci mCherry principalement, mais aussi au profit de la catégorie 1 focus GFP et 2 foci mCherry. L'augmentation du nombre de cellules avec 2 foci GFP et 2 foci mCherry est due à une ségrégation plus précoce de la région *ter* du chromosome (résultats déjà publiés) (Mercier et al., 2008). L'augmentation du nombre de cellules avec 1 seul focus GFP et 2 foci mCherry (donc des cellules dans lesquelles il y a eu répllication et ségrégation de la région *ter*) est probablement due à un défaut de positionnement de la région Ori (ou de la région Right, Figure 54B), conduisant à une colocalisation des deux loci, et donc à la visualisation d'un seul focus en microscopie optique, plutôt qu'à une modification réelle de l'ordre de ségrégation des loci dans la cellule.

Lors de l'insertion d'un site *matS* dans Ori (Figure 54A barres noires), on observe, comme en absence de MatP, une augmentation des cellules avec 2 foci GFP et 2 foci mCherry principalement, mais aussi une petite augmentation des cellules avec 2 foci mCherry et un seul focus GFP. Contrairement à l'absence de MatP, qui provoque une ségrégation précoce de la région *ter*, il est très peu probable que le déplacement d'un site *matS* en dehors de *ter* modifie la ségrégation de la région *ter*. Compte tenu de l'allongement des cellules observé lors du déplacement d'un site *matS* dans Ori, la présence de cellules ayant répliqué et ségrégué à la fois le locus dans la région Ori et le locus dans la région *ter* est probablement due au fait que la division cellulaire est retardée, ce qui laisse le temps à la région *ter* d'être ségréguée.

Concernant l'augmentation du nombre de cellules avec 2 foci mCherry et 1 focus GFP, il est très probable que cela soit due à un défaut de localisation du locus dans la région Ori après réplication et ségrégation, conduisant à une colocalisation des deux loci, plutôt qu'à une modification du pattern de ségrégation du chromosome.

Les résultats obtenus pour la souche dans laquelle le site *matS* a été inséré dans la région Right (Figure 54B barres noires) sont similaires à ceux obtenus pour la souche avec un site *matS* inséré dans la région Ori.

L'insertion d'un site *matS* en dehors de la région terminale du chromosome, que ce soit dans la région Ori ou dans la région Right, modifie le profil de ségrégation du chromosome. Ces modifications semblent dues au fait que (i) le retard de division cellulaire provoqué par l'insertion du site *matS* fait que la ségrégation de la région terminale du chromosome a lieu un peu plus tôt avant la division cellulaire et que (ii) la présence du site *matS* provoque une délocalisation de la région où il est inséré et que cela peut conduire, après ségrégation des deux loci frères, à une colocalisation de ceux-ci, et donc à la visualisation d'un seul focus en microscopie.

1.4.3. La présence d'un site *matS* en dehors de *ter* modifie la localisation cellulaire des loci situés à proximité

Afin de vérifier l'hypothèse d'une modification de la localisation de la région d'insertion du site *matS*, nous avons observé la localisation du locus d'insertion du site *parSp1* inséré soit dans la région Ori (Figure 55A), soit dans la région Right (Figure 55B), à 10 Kb de la position d'insertion du site *matS*, dans une souche sauvage (à gauche), une souche avec un site *matS* déplacé (au milieu) ou dans une souche *matP*- (à droite). Les résultats présentés ici ne concernent que les cellules avec 2 foci, donc les cellules où le locus d'insertion du site *parSp1* a été répliqué et ségrégué.

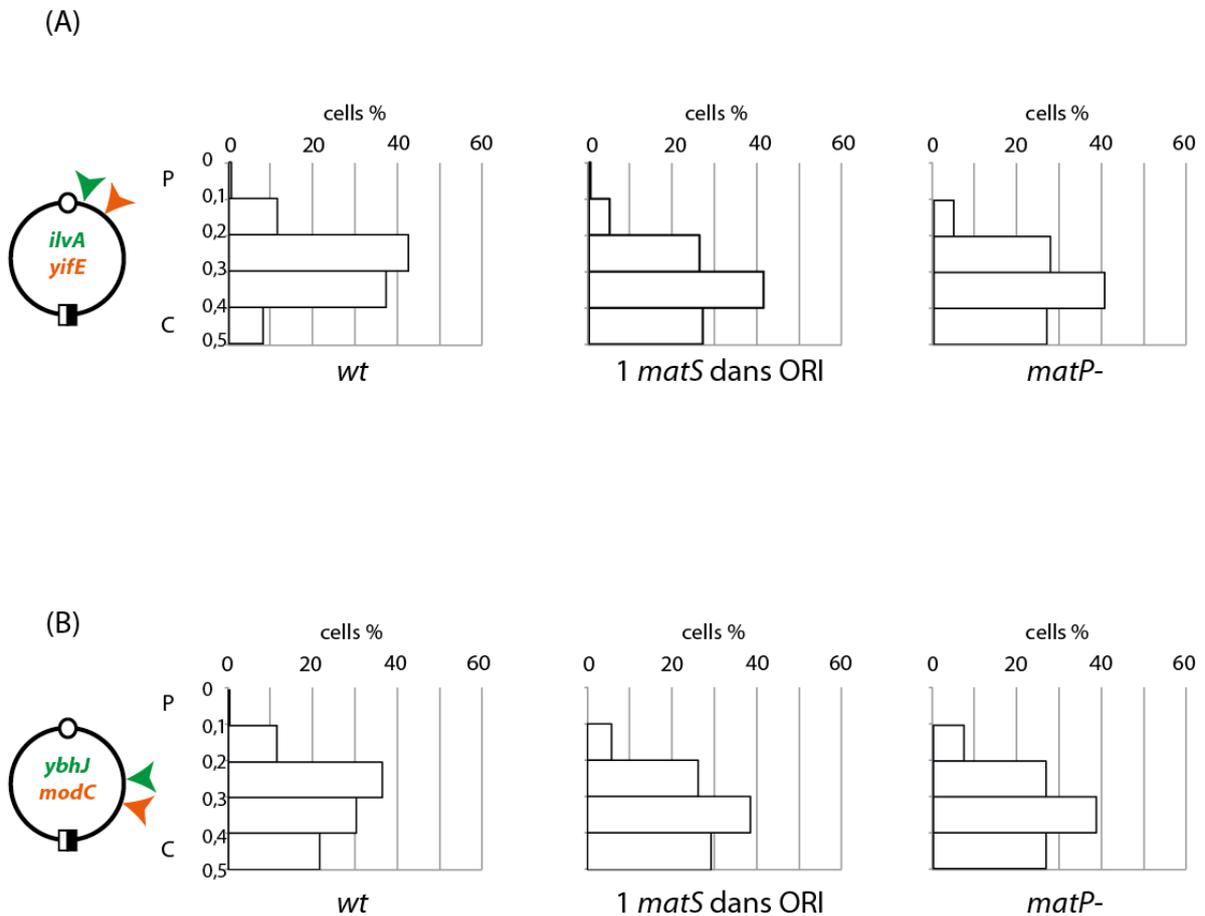


Figure 55 : Positionnement des foci dans la longueur de la cellule dans les cellules à 2 foci

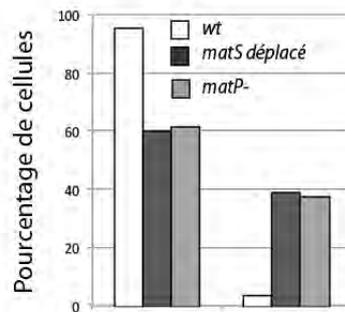
Les foci sont classés en cinq catégories en fonction de leur position dans la longueur de la cellule. Le «P» indique le pôle de la cellule et le «C» le centre de la cellule. Le pourcentage de foci pour chaque catégorie est représenté pour une souche sauvage (à gauche), pour une souche avec un site *matS* déplacé (au milieu) et pour une souche *matP*- (à droite). Les positions d'insertion du site *parSp1* (flèche verte) et du site *matS* (flèche orange) sont indiquées sur la carte génomique à gauche des graphiques. (A) Le site *matS* déplacé a été inséré dans la région Ori, au locus *yifE*, situé à 10Kb environ du locus d'insertion du site *parSp1* (*ilvA*). (B) Le site *matS* déplacé a été inséré dans la région Right, au locus *modC*, situé à 10Kb environ du locus d'insertion du site *parSp1* (*ybhJ*).

Comme vu précédemment (Figure 5 du manuscrit), l'absence de MatP a des conséquences sur la localisation de l'ensemble du chromosome dans la cellule. La région Ori, après réplication et ségrégation, est peu présente au centre de la cellule dans une souche sauvage (8% des foci entre les positions 0,4 et 0,5) (Figure 55A), et principalement présente entre les positions 0,2 et 0,3 (plus de 40% des foci). En absence de MatP, on constate que les foci Ori sont plus présents au centre de la cellule, avec 27% des foci entre les positions 0,4 et 0,5. De plus, la catégorie de cellules la plus représentée est maintenant la catégorie des foci situés entre les positions 0,3 et 0,4, et plus la catégorie des foci situés entre les positions 0,2 et 0,3. L'absence de MatP entraîne donc une relocalisation de la région Ori, qui a maintenant une position plus centrale dans la cellule.

Concernant la région Right après réplication et ségrégation, on observe aussi une localisation plus centrale des foci en absence de MatP (Figure 55B). L'augmentation du nombre de foci situés entre les positions 0,4 et 0,5 est moins frappante que pour la région Ori (21% des foci dans une souche sauvage contre 27% des foci dans une souche *matP*-), mais on note tout de même un décalage vers le centre de l'histogramme de répartition des foci dans la longueur de la cellule. La catégorie la plus représentée est, comme pour la région Ori, la catégorie des foci situés entre les positions 0,3 et 0,4, alors qu'en condition sauvage c'est la catégorie des foci situés entre les positions 0,2 et 0,3 qui est la plus représentée.

Si l'on s'intéresse maintenant aux histogrammes du centre (Figure 55), qui concernent les souches avec un site *matS* déplacé dans Ori ou dans Right, on constate que le site *parS*, situé à proximité du site *matS* déplacé, présente une localisation comparable à la localisation observée en absence de MatP, c'est-à-dire une localisation plus centrale, que ce soit pour le *parS* dans Ori ou le *parS* dans Right. La présence d'un seul site *matS* en dehors de la région terminale du chromosome peut donc modifier la localisation de la région située à proximité du locus d'insertion du site *matS*, et rendre cette région plus fréquemment au centre de la cellule.

(A)



(B)

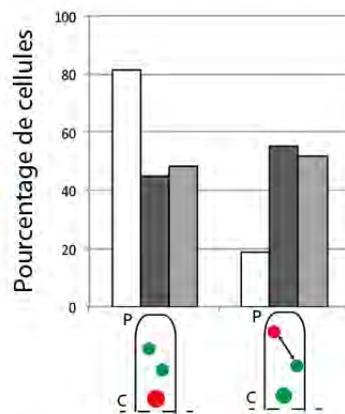


Figure 56 : Orientation du chromosome dans une souche avec 1 site *matS* déplacé

Les cellules avec 1 focus mCherry et 2 foci GFP sont classées en deux catégories en fonction du focus le plus central : le focus mCherry ou un des deux foci GFP. Les deux catégories sont représentées en bas des graphiques. Le «P» indique le pôle de la cellule et le «C» le centre de la cellule. Le pourcentage de foci pour chaque catégorie est représenté pour une souche sauvage (histogramme blanc), pour une souche avec un site *matS* déplacé (histogramme noir) et pour une souche *matP*⁻ (histogramme gris). Les positions d'insertion des sites *parSp1* (flèche verte), *parSpMT1* (flèche rouge) et du site *matS* (flèche orange) sont indiquées sur la carte génomique à gauche des graphiques. (A) Le site *matS* déplacé a été inséré dans la région Ori, au locus *yifE*, situé à 10Kb environ du locus d'insertion du site *parSp1* (*ilvA*). (B) Le site *matS* déplacé a été inséré dans la région Right, au locus *modC*, situé à 10Kb environ du locus d'insertion du site *parSp1* (*ybhJ*).

1.4.4. La présence d'un site *matS* en dehors de *ter* modifie l'orientation du chromosome

Nous avons ensuite regardé l'orientation du chromosome dans nos souches avec un site *matS* déplacé. Pour cela, nous avons regardé, dans les cellules avec 1 focus mCherry et deux foci GFP (les cellules ayant répliqué et ségrégué la région d'insertion du site *matS* mais pas la région terminale du chromosome), l'ordre des foci le long de l'axe longitudinal de la cellule (Figure 56).

En condition sauvage (Figure 56 barres blanches), la région terminale du chromosome (focus mCherry) est, dans la grande majorité des cas, plus centrale que la région Ori (95% des cellules avec 2 foci GFP et 1 focus mCherry) et que la région Right (80% des cellules avec 2 foci GFP et 1 focus mCherry). En absence de MatP, l'orientation du chromosome est modifiée puisqu'on observe une augmentation du nombre de cellules avec 1 focus GFP, donc 1 locus dans Ori (Figure 56A) ou 1 locus dans Right (Figure 56B) plus central que la région terminale du chromosome. Ces résultats ont déjà été présentés dans le manuscrit, et montrent que le maintien de la région terminale du chromosome au centre de la cellule par MatP est nécessaire à la localisation et à l'orientation correcte du chromosome dans la cellule. Pour rappel, en condition sauvage, dans les cellules pré-divisionnelles, le chromosome a une orientation *Left-Right-Ter-Left-Right* (Figure 29).

Lorsqu'un site *matS* est inséré dans la région Ori (Figure 56A) ou dans la région Right (Figure 56B), on observe que la région à proximité du site *matS*, après réplication et ségrégation, est plus fréquemment plus au centre que la région terminale du chromosome non ségréguée. Dans presque 40% des cellules avec 1 site *matS* dans Ori et avec 2 foci GFP et 1 focus mCherry (Figure 56A barres noires), et dans plus de 50% des cellules avec 1 site *matS* dans Right et avec toujours 2 foci GFP et 1 focus mCherry (Figure 56B barres noires), on a une perte de l'orientation normale du chromosome *Left-Right-Ter-Left-Right*. L'insertion d'un seul site *matS* en dehors de la région terminale du chromosome peut provoquer une perte de l'orientation du chromosome, dans au moins une partie de la population cellulaire.

L'ensemble des résultats obtenus lorsqu'un site *matS* est déplacé en dehors de la région terminale du chromosome laisse penser que la présence d'un site *matS*, et donc de MatP, peut changer le comportement d'une région chromosomique autre que la région *ter*, notamment en changeant sa localisation après réplication, et en la rendant plus centrale. La présence plus fréquente de la région d'insertion du site *matS* au centre de la cellule a pour conséquence la présence plus fréquente de sites SBS, et donc de SImA, au centre de la cellule puisque les sites *matS* ont été insérés dans des régions possédant des sites SBS. Et c'est cette présence plus fréquente de SImA au centre de la cellule qui peut être responsable d'un retard de mise en place de l'anneau Z, et donc d'un retard de division cellulaire, conduisant à un allongement des cellules.

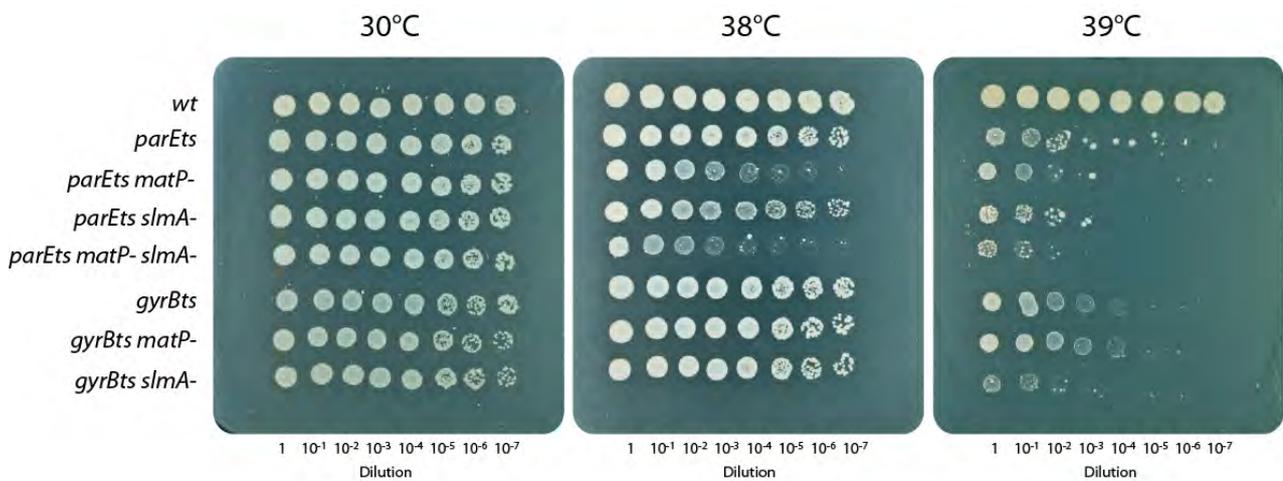


Figure 57 : L'inactivation partielle de la TopoIV est moins bien tolérée dans un contexte *matP*-

Les huit souches ont été cultivées à 30°C pendant 6 heures sans antibiotiques. Chaque souche a été diluée de la dilution 1 à la dilution 10⁻⁷. 5 µl de chaque dilution a été déposé sur boîte LA sans antibiotique. Les boîtes ont été incubées une nuit à 30, 38 ou 39°C. Les photos ont été prises le lendemain matin. (Expérience réalisée par Carine Pagès)

2. Partie 2 : Rôle de la TopoIV dans les étapes tardives du cycle cellulaire

2.1. Résultats préliminaires

Lorsque j'ai commencé ma thèse, en 2012, différentes études montraient que la TopoIV jouait un rôle prépondérant, à la fin du cycle cellulaire, en permettant la résolution des liens d'intercaténation. En effet, la TopoIV est principalement active durant la phase post-réplication (Espéli et al., 2003b) et le site *dif* apparaît comme un site de clivage préférentiel pour la TopoIV (Hojgaard et al., 1999). De plus, un lien entre FtsK et la TopoIV a été mis en évidence dans différentes études (Bigot and Mariani, 2010; Espéli et al., 2003a), sans toutefois réussir à obtenir un modèle clair. Ces différents partenaires, ainsi que MatP, la protéine majeure d'organisation de la région *ter* du chromosome, interviennent tous au même moment du cycle cellulaire (entre la fin de la réplication et la division cellulaire), dans un emplacement restreint (au niveau de la région terminale du chromosome, située à proximité immédiate du divisome) et ont un même objectif (la ségrégation correcte des deux chromosomes frères dans les deux futures cellules filles). Ces arguments laissaient penser qu'il existait une interaction fonctionnelle entre ces différents partenaires.

Pour étudier cette interaction fonctionnelle, nous possédons au laboratoire les allèles *parE10* et *parC1215*, qui codent des sous-unités ParE et ParC thermosensibles (Kato et al., 1990). Ces souches permettent, à température non permissive, d'inactiver partiellement la TopoIV. Avant de commencer ma thèse dans l'équipe de François Cornet, Carine Pagès avait commencé à étudier le rôle de MatP et de SImA dans l'activité de la TopoIV. Pour cela, elle a regardé la viabilité de différents mutants à des températures permissives et non permissives (Figure 57). Comme décrit précédemment dans la littérature, à 39°C (température non permissive), on observe une baisse de viabilité cellulaire de la souche *parEts*. Il en est de même pour la souche *gyrBts*. A 30°C comme à 38°C, les souches *parEts* et *gyrBts* présentent une viabilité cellulaire normale (Grainge et al., 2007). En revanche, en absence de MatP, la souche *parEts* présente une forte baisse de viabilité dès 38°C.

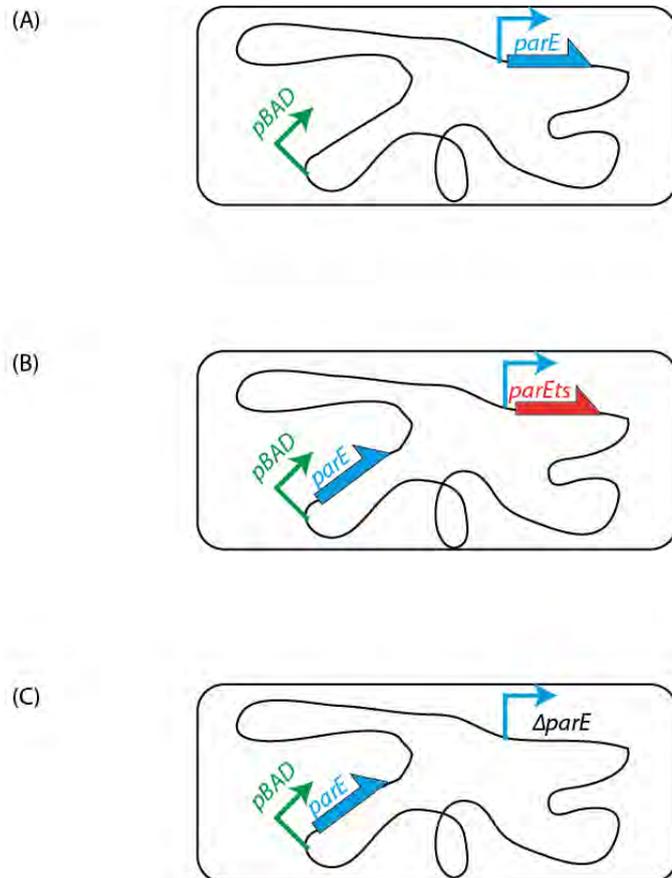


Figure 58 : Constructions pour moduler l'expression de la TopoIV

(A) Dans une souche sauvage, le gène *parE* (ou *parC*) est sous la dépendance de son propre promoteur. (B) Le gène *parE* (ou *parC*) a été placé sous la dépendance du promoteur *pBAD* chromosomique. Pour vérifier la construction, nous avons regardé si elle complémentait une mutation *parEts* (ou *parCts*), à la place de la copie sauvage de *parE* (ou *parC*). (C) Après vérification de la construction, la copie sauvage du gène *parE* (ou *parC*) a été déléetée.

L'absence de SlmA ne change pas le phénotype de la souche *parEts*. Dans la souche *gyrBts*, la délétion de MatP n'a pas d'effets sur la viabilité cellulaire, quelle que soit la température.

Une inactivation partielle de la TopoIV est donc moins bien tolérée en absence de MatP. Ces résultats préliminaires nous permettent de mettre en évidence une synergie entre MatP et la TopoIV, et laisse supposer que la structuration de la région *ter* par MatP et/ou la localisation de la région *ter* à proximité du septum de division joue un rôle dans l'activité de décaténation de la TopoIV.

2.2. Mise au point d'un outil permettant de moduler l'expression de la TopoIV

Afin de pouvoir regarder plus finement les effets d'une sur- ou d'une sous-expression de la TopoIV, et de ce fait le rôle des liens d'intercaténation dans la dynamique de la région *ter* du chromosome, nous avons placé les gènes *parC* et *parE* sous la dépendance du promoteur *pBAD* chromosomique (Figure 58B), inductible à l'arabinose. Après avoir vérifié que les constructions étaient capables de compléter les mutations *parEts* et *parCts* à température non permissive (Figure 58B), j'ai pu déléter les copies sauvages des gènes (Figure 58C), et regarder les effets d'un sur- ou d'une sous-production de la TopoIV en utilisant une gamme croissante d'arabinose.

Après avoir testé différentes gammes de concentration en arabinose, nous avons choisi de travailler avec la gamme suivante : 0%, 0,01%, 0,02%, 0,05%, 0,1%, 0,5% et 1% (Figure 58). La concentration en arabinose n'influence pas la croissance cellulaire de la souche *wt* (Figure 58A). En absence d'arabinose, la fuite de promoteur *pBAD* ne permet pas de restaurer la viabilité cellulaire ni de la souche $\Delta parE pBAD::parE$ ou ni de la souche $\Delta parC pBAD::parC$. On voit bien ensuite que la restauration de la viabilité cellulaire est dépendante de la concentration en arabinose. A partir de 0,2%, on retrouve un phénotype de viabilité de type sauvage. Si l'on compare les souches $\Delta parE pBAD::parE$ (pour plus de clarté, la souche sera par la suite nommée *parE**) (Figure 59B) et $\Delta parC pBAD::parC$ (*parC**) (Figure 59C) cultivées avec 0,05% ou 0,1% d'arabinose, on voit qu'il y a une légère différence entre les deux souches.

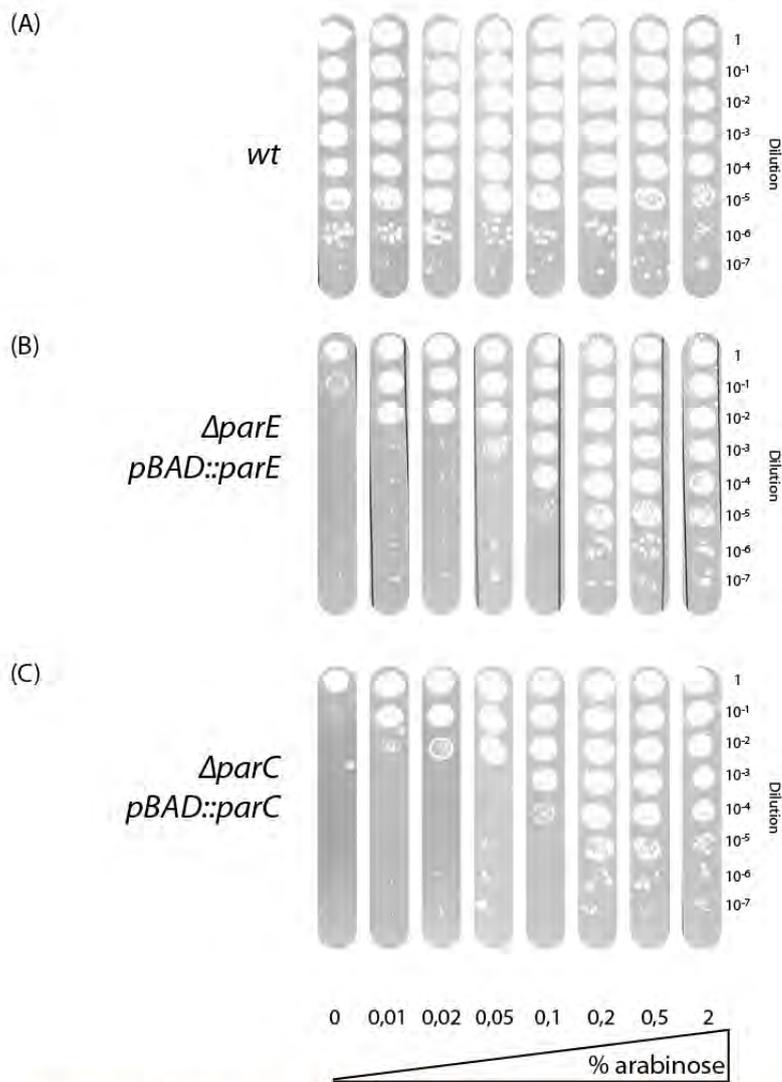


Figure 59 : Effets de la modulation de l'expression de la TopoIV sur la viabilité cellulaire

Les souches ont été cultivées à 37°C en présence de 2% d'arabinose pendant 6 heures. Après 2 rinçages en LB, chaque souche a été diluée de la dilution 1 à la dilution 10^{-7} . 5 μ l de chaque dilution a été déposée sur boîte LA avec une concentration croissante en arabinose. Les boîtes ont été incubées une nuit à 37°C. Les photos ont été prises le lendemain matin. (A) La souche possède une copie sauvage du gène *parC* et une copie sauvage du gène *parE*. (B) La souche est délétée pour la copie sauvage du gène *parE*, et possède une copie ectopique de *parE* sous le promoteur *pBAD* chromosomique. (C) La souche est délétée pour la copie sauvage du gène *parC*, et possède une copie ectopique de *parC* sous le promoteur *pBAD* chromosomique.

La souche *parE** pousse mieux que la souche *parC**. En effet, avec 0,05% d'arabinose, on observe des colonies isolées sur la dilution 10^{-3} pour *parE** alors que pour *parC**, on observe uniquement un fond de croissance pour les dilutions 1, 10^{-1} et 10^{-2} , mais aucune colonies isolées sur les autres dilutions. De même, avec une concentration de 0,1% d'arabinose, on observe des colonies isolées sur la dilution 10^{-5} pour *parE* et seulement sur la dilution 10^{-4} pour *parC*. A partir de 0,2% d'arabinose, et jusqu'à 2% d'arabinose, on ne voit pas de différence de viabilité entre la souche sauvage et les souches *parE** et *parC**.

Ces premiers résultats montrent qu'il est possible de moduler l'expression de la TopoIV en modulant l'expression de l'une ou de l'autre sous-unité de la TopoIV, grâce à l'utilisation de différentes concentrations d'arabinose. Il est ensuite possible de voir les conséquences de cette modulation de la TopoIV sur la viabilité cellulaire en réalisant des tests en goutte.

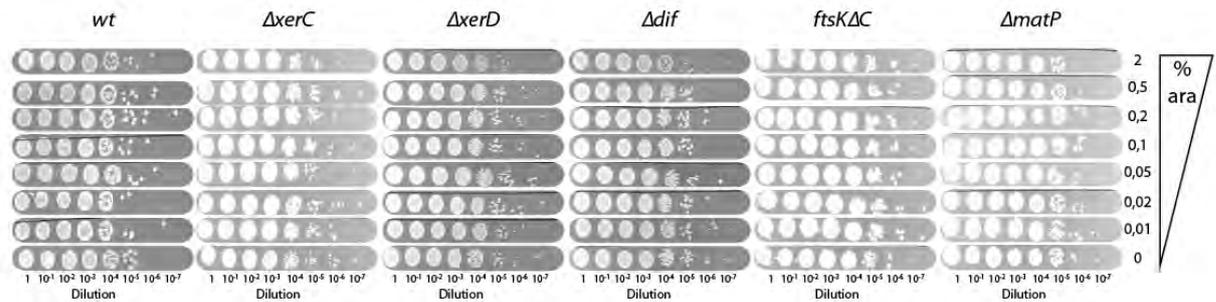
2.3. Effets synergiques de la TopoIV, de XerCD/*dif*/FtsK et de MatP

2.3.1. La diminution de la quantité de TopoIV couplée à une délétion de *xerC*, *xerD*, *dif* ou *matP* affecte la viabilité cellulaire

Les différentes souches de délétion ($\Delta xerC$, $\Delta xerD$, Δdif , $\Delta ftsKC$ et $\Delta matP$) ont un phénotype de viabilité cellulaire comparable à la souche *wt*, qui est indépendant de la concentration en arabinose (Figure 60A).

Lorsque l'on diminue la quantité de TopoIV dans la cellule, en faisant varier la concentration en arabinose, et donc en faisant varier l'expression du gène *parE* placé sous la dépendance du promoteur pBAD, on observe des effets différents sur les différentes souches de délétion (Figure 60B). Comme vu précédemment (Figure 59B), la souche *parE** présente un phénotype sauvage à partir de 0,2% d'arabinose (observation de colonies isolées à partir de la dilution 10^{-5} pour 0,2%, 0,5% et 2% d'arabinose), et une viabilité intermédiaire à 0,05% et 0,1% d'arabinose (observation de colonies isolées à la dilution 10^{-3} avec 0,05% d'arabinose et à la dilution 10^{-4} avec 0,1% d'arabinose).

(A)



(B)

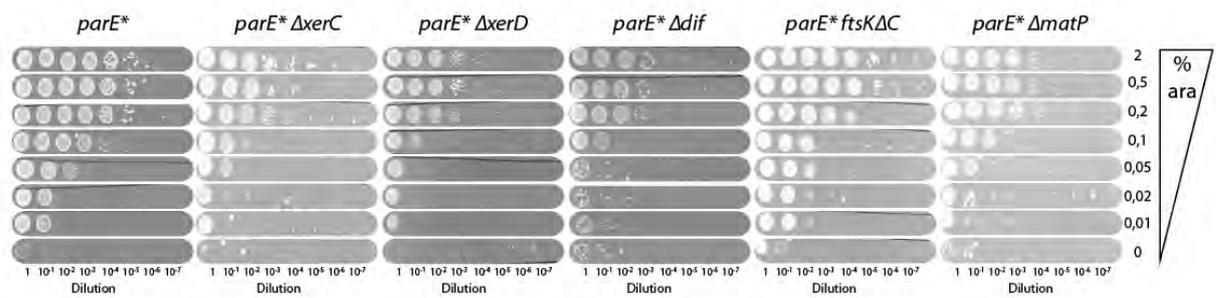


Figure 60 : Effets synergiques de la TopoIV, de la recombinaison XerCD/dif et de MatP

Les souches ont été cultivées à 37°C en présence de 0,5% d'arabinose pendant 6 heures. Après 2 rinçages en LB, chaque souche a été diluée de la dilution 1 à la dilution 10^{-7} . 5 μ l de chaque dilution a été déposé sur boîte LA avec une concentration croissante en arabinose. Les boîtes ont été incubées une nuit à 37°C. Les photos ont été prises le lendemain matin. (A) Les souches possèdent la copie sauvage du gène *parE*. (B) Les souches sont délétées de la copie sauvage du gène *parE*. Elles possèdent une copie ectopique de *parE*, sous la dépendance du promoteur pBAD chromosomique.

Les souches *parE** $\Delta xerC$, *parE** $\Delta xerD$ et *parE** Δdif présentent une efficacité de formation de colonies plus faible que la souche *parE**, à concentration en arabinose équivalente (Figure 60B). Alors qu'à partir de 0,2% d'arabinose, on restaure le phénotype sauvage de la souche *parE**, une concentration de 2% d'arabinose n'est pas suffisante pour restaurer le phénotype sauvage de ces trois souches de délétion (observation de colonies isolées à la dilution 10^{-3} seulement).

La souche *parE** $\Delta ftsK\Delta C$ (délétion du domaine C-terminal de FtsK, impliqué dans l'activation de la recombinaison *XerCD/dif* et dans la ségrégation de la région terminale du chromosome) a un phénotype moins marqué que les trois souches précédentes. Elle présente seulement un léger retard de croissance comparé à la souche *parE**, avec un phénotype de type sauvage restauré à partir de 0,5% d'arabinose (Figure 60B).

Enfin la souche *parE** $\Delta matP$ présente un phénotype intermédiaire, avec des colonies isolées observables sur la dilution 10^{-4} pour 0,2%, 0,5% et 2% d'arabinose (Figure 60B). Quelle que soit la concentration d'arabinose, on observe une différence d'un facteur 10 entre la souche *parE** et la souche *parE** $\Delta matP$.

L'ensemble de ces résultats montrent qu'il existe une synergie entre la TopoIV, la recombinaison *XerCD/dif* activée par FtsK et MatP, responsable de l'organisation et de la localisation de la région *ter*, puisque lorsque l'on délète un seul de ces composants, on observe une diminution de la viabilité cellulaire à concentration égale d'arabinose, et donc à concentration égale de TopoIV. En absence d'un des composants de la recombinaison *XerCD/dif* activée par FtsK ou de MatP, les souches sont donc plus dépendantes de la quantité de TopoIV présente dans la cellule.

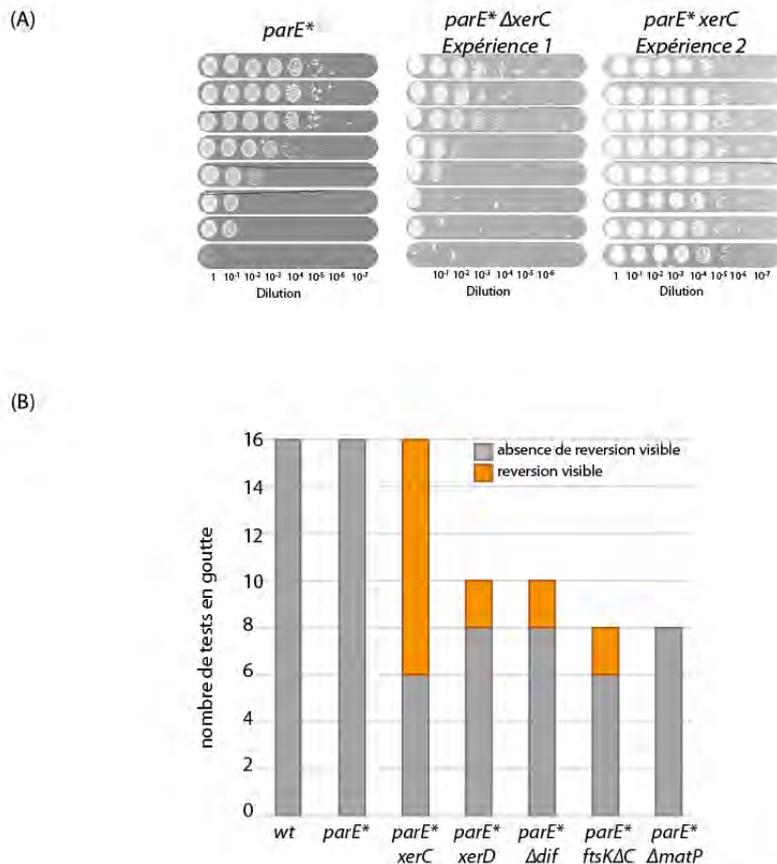


Figure 61 : L'apparition de révertants indique une synergie entre la TopoIV et XerCD/dif/FtsK

(A) Exemple de deux expériences réalisées avec la même souche, dans les mêmes conditions (culture à 37°C en présence de 0,5% d'arabinose pendant 6 heures/2 rinçages en LB/dilution de 1 à 10^{-7} / dépôt de 5 μ l de chaque dilution sur boîte LA avec une concentration croissante en arabinose/incubation une nuit à 37°C). (B) Mesure de la fréquence d'apparition de révertants lors de la réalisation des tests en goutte. En fonction des souches, entre 8 et 16 tests en goutte indépendants ont été réalisés. Le nombre de tests où l'on constate une apparition de révertants est indiqué en orange.

2.3.2. L'apparition fréquente de révertants indique une synergie forte entre l'activité de la TopoIV et la recombinaison XerCD/*dif* activée par FtsK

Lors de la réalisation de ces tests en goutte pour analyser la viabilité cellulaire des différentes souches et donc les conséquences d'une baisse de concentration de la TopoIV en absence des différents acteurs de la ségrégation de la région *ter* du chromosome, nous avons très vite constaté l'apparition fréquente de révertants (Figure 61A expérience 2). Si l'on prend l'exemple de la souche *parE** $\Delta xerC$, nous avons régulièrement observé un phénotype de type sauvage, avec une efficacité de formation de colonies entièrement restaurée, quelle que soit la concentration en arabinose (Figure 61A expérience 2). Les révertants n'étant plus sensibles à la variation de la concentration en arabinose, nous pouvons en déduire qu'il y a certainement eu une mutation dans le promoteur *pBAD*, permettant une expression continue du gène *parE* ectopique.

Nous avons ensuite regardé à quelle fréquence il y avait apparition de révertants en fonction des différentes délétions (Figure 61B). Pour la souche *parE** $\Delta xerC$, nous avons constaté l'apparition de révertants dans plus de la moitié des tests en goutte réalisés (10 expériences sur 16 soit 62,5% des expériences). Pour les souches *parE** $\Delta xerD$ et *parE** Δdif , nous avons constaté l'apparition de révertants dans 2 expériences sur 10 (20%) et pour la souche *parE** $\Delta ftsK\Delta C$ dans 2 expériences sur 8 (25%). Sur les 8 expériences réalisées avec la souche *parE** $\Delta matP$, nous n'avons jamais constaté l'apparition de révertants.

Concernant les expériences où nous n'avons pas constaté l'apparition de révertants caractérisés par une absence de réponse aux variations de concentration en arabinose, il nous est impossible de dire si nous sommes en présence de souches sans mutations supplémentaires. En effet, même si les souches semblent répondre toujours de façon croissante à une augmentation de la concentration en arabinose, on ne peut garantir l'apparition d'une mutation compensatoire quelque part, qui (i) modifierait la sensibilité du promoteur à l'arabinose, (ii) modifierait l'import ou l'export de l'arabinose dans le cytoplasme, et donc la disponibilité de l'arabinose au niveau du promoteur *pBAD* ou bien (iii) n'importe quelle autre mutation qui modifierait l'activité de la TopoIB ou le besoin en TopoIV de la cellule.

L'apparition d'un grand nombre de révertants indique qu'il y a probablement co-létalité entre la diminution de la quantité de TopoIV dans la cellule, et certaines des délétions réalisées. Pour pallier à cette co-létalité, il y aurait une sélection positive des mutations dans le promoteur pBAD, afin de rétablir une concentration normale et stable de TopoIV. Même si ce test en goutte ne nous permet pas d'évaluer précisément le taux d'apparition de révertants, on note toutefois que le taux d'apparition de révertants est beaucoup plus importants pour le mutant *parE** $\Delta xerC$ (62,5%) que pour les autres souches délétées d'un des composants du système de recombinaison XerCD/*dif*/FtsK. Il semblerait donc qu'il existe une synergie forte entre la TopoIV et le système de recombinaison XerCD/*dif*/FtsK, notamment XerC, qui semble essentiel lorsque la concentration en TopoIV diminue, d'où l'apparition d'un grand nombre de révertants. Il est intéressant de noter que l'on a même constaté l'apparition de révertants lorsque les souches ont été cultivé 6h en présence de 2% d'arabinose (contre 0,5% dans les expériences présentées), ce qui signifie qu'une haute concentration en arabinose ne restaure pas la croissance normale des souches et permet une sélection des mutations de reversion.

De plus, nous n'avons pas constaté d'apparition de révertants pour la souche *parE** $\Delta matP$, bien que l'absence de MatP rende la souche plus sensible à une diminution de la concentration en arabinose, et donc à une diminution de la quantité de TopoIV. Il semblerait donc que la synergie entre la TopoIV et MatP soit moins forte que la synergie entre la TopoIV et la recombinaison XerCD/*dif* activée par FtsK.

2.3.3. XerC joue un rôle majeur dans la synergie entre la TopoIV et la recombinaison XerCD/*dif* activée par FtsK

Afin de pouvoir analyser de manière plus précise les conséquences des différentes délétions sur l'activité de la TopoIV, nous avons utilisé un test basé que la sensibilité aux quinolones. Pour cela, nous avons utilisé une souche avec une mutation *gyrA*^{*nalR*} (mutation D87Y ; pour plus de clarté, cette souche sera appelée *nalR* par la suite). Dans cette souche, la cible principale des quinolones devient la TopoIV, puisque la Gyrase possède une mutation dans *gyrA* lui conférant la résistance aux quinolones. Cela permet d'utiliser la sensibilité aux quinolones comme un indicateur de l'activité de la TopoIV dans la cellule.

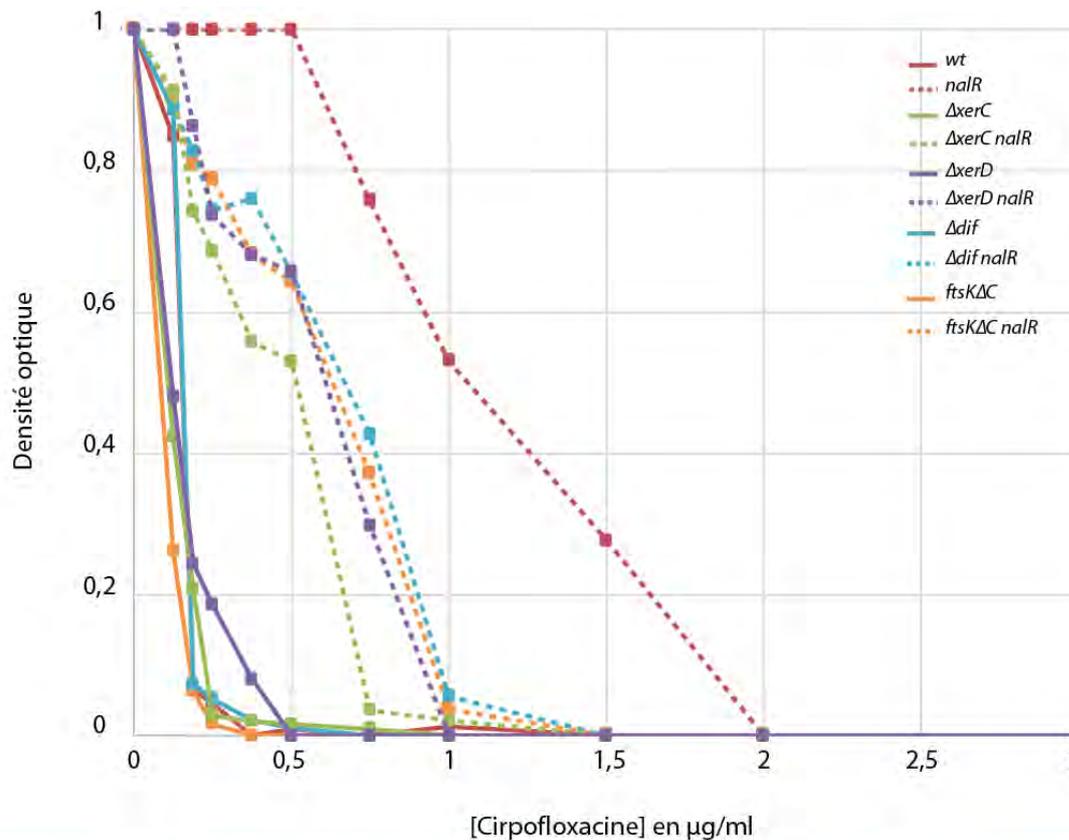


Figure 62 : Evaluation de la synergie entre la TopoIV et XerCD/dif/FtsK par détermination de la CMI

Les différentes souches ont été cultivées une nuit en absence de Ciprofloxacine. Une gamme de Ciprofloxacine de concentration décroissantes par dilutions successives de moitié a été réalisée, à partir d'un premier tube avec une concentration de 3 µg/ml. Chaque tube a été ensemencé à partir de la pré-culture de nuit, à équivalent DO 0,005 puis incubé 6h à 37°C. La DO à 600nm a ensuite été mesurée pour chaque souche, et chaque concentration en Ciprofloxacine. Les valeurs de DO supérieures à 1 pour les tubes sans Ciprofloxacine ont été rapportés à 1. Les courbes en trait plein correspondent aux souches n'ayant pas de mutation dans le gène *gyrA*. Les courbes en pointillés correspondent aux souches portant la mutation D87Y dans le gène *gyrA*.

Nous avons tout d'abord comparé la sensibilité d'une souche *wt* avec une souche *nalR*, en calculant la CMI (Concentration minimale inhibitrice) de Ciprofloxacine en liquide (famille des quinolones de 2^{ème} génération = fluoroquinolones) (Figure 62, courbe rouge). La souche *nalR* a une CMI de 2µg/ml alors que la souche sauvage a une CMI inférieure à 0,5µg/ml. La souche *nalR* présente donc une sensibilité aux quinolones plus faible que la souche sauvage.

Nous avons ensuite regardé quelles étaient les conséquences de la délétion de *xerC*, *xerD*, *dif* et *ftsK* sur la sensibilité aux quinolones, dans une souche ayant l'allèle sauvage de *gyrA* (Figure 62, traits pleins). Dans ces souches, où la cible principale de la Ciprofloxacine est la Gyrase, et non la TopoIV, on n'observe pas de différence de CMI comparé à la souche sauvage. Il n'y a donc pas de conséquences d'une inactivation du système XerCD/*dif*/FtsK lorsque l'activité de la Gyrase est diminuée par la présence de Ciprofloxacine.

En revanche, lorsque l'on délète l'un des composants du système XerCD/*dif*/FtsK dans une souche *nalR* (Figure 62, traits en pointillé), on observe une plus grande sensibilité de ces souches à la Ciprofloxacine, ce qui signifie que la diminution de la quantité de TopoIV active dans la cellule est plus délétère pour la cellule en absence du système XerCD/*dif*/FtsK. De plus, la mesure de la CMI pour chacune de ces souches permet de mettre en évidence que l'absence de XerC est significativement plus délétère que l'absence des autres composants du système XerCD/*dif*/FtsK (on observe une CMI de 0,75µg/ml pour la souche *nalR* Δ XerC alors que la CMI est de 1µg/ml pour les autres souches). Cela suggère que XerC joue un rôle spécifique dans l'activité de la TopoIV.

Ces résultats sont en accord avec les résultats préliminaires obtenus avec les tests en goutte ainsi qu'avec le taux de réversion mesuré pour les différentes souches. Cette méthode nous a permis de mesurer, de manière plus fine, les différences de synergie entre les différents composants du système XerCD/*dif*/FtsK et la TopoIV, et de mettre en évidence le rôle prépondérant de XerC dans l'activité de la TopoIV.

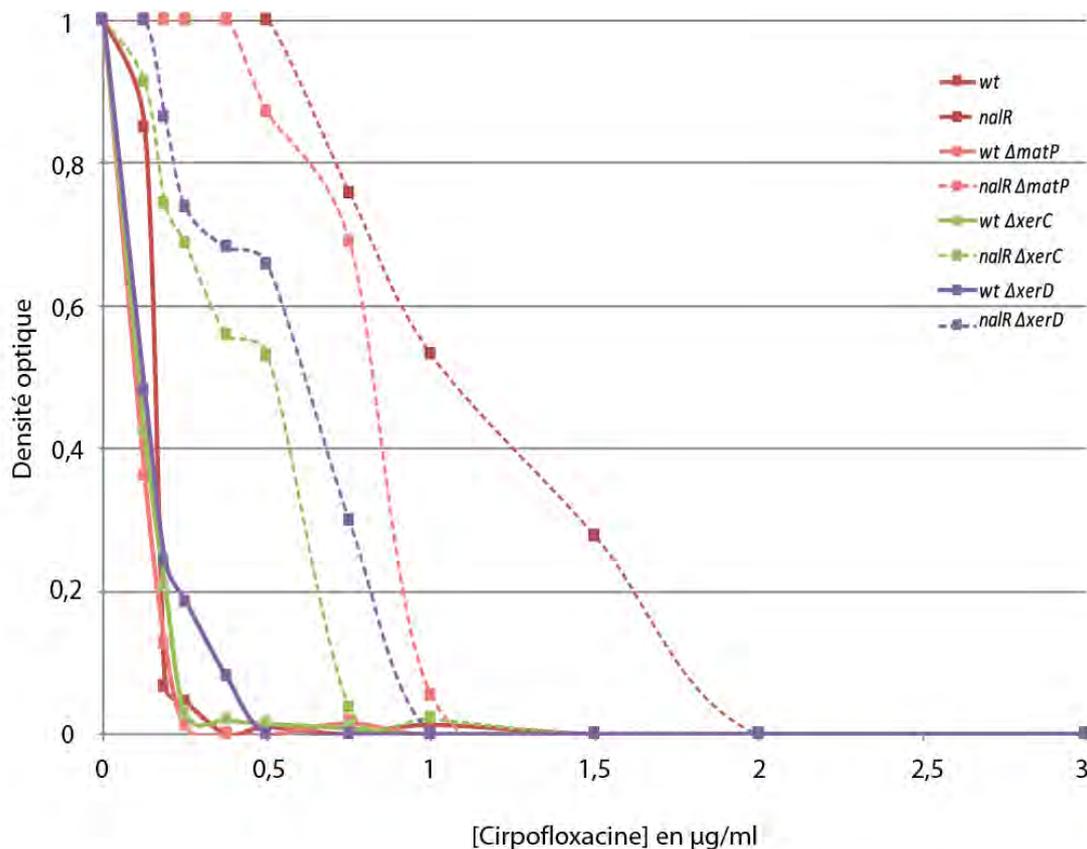


Figure 63 : Evaluation de la synergie entre la TopoIV et MatP par détermination de la CMI

Les différentes souches ont été cultivé une nuit en absence de Ciprofloxacine. Une gamme de Ciprofloxacine de concentration décroissantes par dilutions successives de moitié a été réalisé, à partir d'un premier tube avec une concentration de $3\mu\text{g/ml}$. Chaque tube a été ensemencé à partie de la pré-culture de nuit, à équivalent DO 0,005 puis incubé 6h à 37°C . La DO à 600nm a ensuite été mesuré pour chaque souche, et chaque concentration en Ciprofloxacine. Les valeurs de DO supérieures à 1 pour les tubes sans Ciprofloxacine ont été rapporté à 1. Les courbes en trait plein correspondent aux souches n'ayant pas de mutation dans le gène *gyrA*. Les courbes en pointillé correspondent aux souches portant la mutation D87Y dans le gène *gyrA*.

2.3.4. MatP joue un rôle plus mineur dans l'activité de la TopoIV

Nous avons ensuite regardé les conséquences de la délétion de MatP sur la sensibilité des différentes souches à la Ciprofloxacine. Comme pour les autres délétions, en présence de l'allèle sauvage de *gyrA*, la souche $\Delta matP$ est très sensible à la Ciprofloxacine et a une CMI inférieure à 0,5 μ g/ml (Figure 63, trait plein rose).

La délétion de MatP dans la souche *nalR* présente un phénotype intermédiaire. La courbe de sensibilité à la Ciprofloxacine (Figure 63, trait en pointillés rose) de la souche $\Delta matP nalR$ se trouve entre la courbe de la souche $\Delta xerD nalR$ (ici nous n'avons représenté que la souche $\Delta xerD nalR$, qui se comporte de la même façon que les souches $\Delta dif nalR$ et $ftsK\Delta C nalR$) et la courbe de la souche *nalR*. La CMI de la souche $\Delta matP nalR$ est aux alentours de 1 μ g/ml comme pour les trois autres souches.

Ces résultats montrent que MatP, par elle-même ou via son rôle dans l'organisation et la localisation de la région *ter* au centre de la cellule, joue un rôle dans l'activité de la TopoIV. Le rôle de MatP est moins important que le rôle de la recombinaison XerCD/*dif* activée par FtsK, et surtout que le rôle de XerC, dans l'activité de la TopoIV.

2.4. Intégration des résultats dans l'article « Mapping Topoisomerase IV Binding and Activity Sites on the E. coli Genome »

Les résultats obtenus *in vivo* sur la synergie entre l'activité de la TopoIV, la recombinaison XerCD/*dif* activée par FtsK et MatP ont fait l'objet d'une publication, en collaboration avec l'équipe d'Olivier Espeli (Collège de France – Paris), présentée en annexe 2. Ici, je ne présenterai pas la totalité de l'article, mais uniquement les résultats concernant l'activité de la TopoIV à la fin du cycle cellulaire, et le rôle des acteurs de la ségrégation de la région *ter* du chromosome dans l'activité de la TopoIV, qui viennent compléter les résultats présentés dans la partie précédente.

2.4.1. XerC localise la TopoIV au site *dif*

Les expériences de CHIP-seq et de NorfIIP réalisées par l'équipe d'Olivier Espeli ont confirmé que la TopoIV se fixe et clive préférentiellement l'ADN à proximité immédiate du site *dif*. Le clivage par la TopoIV au niveau du site *dif* est dépendant de la présence du site *dif*, et en particulier de la présence du bras de fixation de XerC, ainsi que de la présence de XerC et de XerD. Par contre, le clivage de la TopoIV au niveau des autres sites est indépendant de la présence du site *dif* ou de XerC. Cela suggère que l'influence de XerC sur la TopoIV est spécifique au site *dif*.

Pour tester la fixation de la TopoIV au niveau du site *dif*, des retards sur gel ont été effectués avec des fragments contenant ou non un site *dif* et la TopoIV, en présence ou non de XerC et de XerD. Cette expérience montre que la fixation de la TopoIV sur l'ADN contenant un site *dif* est grandement améliorée en présence de XerC seule, ou de XerC et XerD.

L'ensemble de ces résultats suggère fortement une interaction entre la TopoIV et XerC, nécessaire à la fixation et au clivage de la TopoIV au niveau du site *dif*. Le fait que la surexpression du domaine C-terminal de ParC réduise le clivage de la TopoIV au niveau du site *dif* suggère que la TopoIV pourrait interagir avec XerC via son domaine C-terminal. Cette interaction permettrait de localiser la TopoIV au niveau du site *dif* et d'augmenter sa capacité de clivage à cet emplacement uniquement.

2.4.2. L'activité de la TopoIV à *dif* dépend de l'organisation de la région *ter* par MatP

Compte tenu des résultats préliminaires obtenus avec le double mutant *parEts ΔmatP* ainsi qu'avec la souche *nalR ΔmatP*, l'équipe d'Olivier Espeli a testé la capacité de clivage de la TopoIV à *dif*, ainsi qu'à un autre site de clivage situé dans la région *ter*, en présence ou en absence de MatP. Les résultats obtenus montrent que seul le clivage au niveau du site *dif* est dépendant de la présence de MatP.

L'ensemble de ces résultats suggère que MatP et/ou l'organisation de la région *ter* par MatP sont importantes pour l'activité de la TopoIV au niveau du site *dif*.

Conclusion, discussion et perspectives

1. Conclusion générale

1.1. Rôle de MatP dans l'organisation globale du chromosome

Nous avons montré, dans la première partie de ce manuscrit, que MatP n'avait pas seulement un rôle dans l'organisation et la localisation de la région terminale du chromosome, mais aussi dans l'organisation globale du chromosome dans les cellules pré-divisionnelles. En effet, nous avons constaté que l'absence de MatP, en plus de modifier la localisation et la ségrégation de la région *ter*, modifie la localisation des autres régions du chromosome. Cette modification de la localisation de ces régions s'accompagne d'une modification de l'orientation du chromosome : l'orientation *Left-Right-Ter-Left-Right* à la fin du cycle cellulaire est perdue dans une partie de la population.

Les résultats préliminaires obtenus avec l'insertion d'un site *matS* en dehors de *ter* montrent que la présence de MatP en dehors de la région *ter* peut modifier la localisation de cette région, et la rendre plus centrale après réplication et ségrégation, alors même que le site *matS* est inséré dans des régions structurées ayant une localisation précise au cours du cycle cellulaire.

1.2. MatP contrôle la division cellulaire via la localisation de SlmA

Nous avons aussi montré que le mauvais positionnement du chromosome dans la cellule en absence de MatP avait une conséquence directe sur la division cellulaire. En effet, cela a pour conséquence un mauvais positionnement de SlmA, qui se lie aux sites SBS présents sur l'ensemble du chromosome sauf dans la région *ter*. La présence de SlmA au centre de la cellule, compte tenu de son activité inhibitrice sur la formation de l'anneau Z, va retarder la mise en place du divisome et donc retarder la division cellulaire. MatP permettrait donc de contrôler la division cellulaire grâce à l'exclusion des régions autres que *ter* du centre de la cellule, et donc l'exclusion de SlmA.

1.3. MatP crée un substrat préférentiel pour FtsK

L'étude de l'interaction entre le chromosome et le divisome, et en particulier FtsK nous a permis de mettre en évidence le rôle de MatP dans la délimitation de la région d'activité préférentielle de Ftsk (la FHAR = FtsK High Activity Region). En effet, en présence de MatP, FtsK interagit préférentiellement avec une zone du chromosome de 400 Kb, comprenant le site *dif*. En revanche, en absence de MatP, FtsK peut interagir, faiblement, avec toutes les régions du chromosome. MatP permet donc de créer un substrat préférentiel pour FtsK, qui est nécessaire à la ségrégation des deux régions terminales nouvellement répliquées, mais aussi à la résolution des dimères de chromosome.

1.4. Contrôle de l'activité de la TopoIV à la fin du cycle cellulaire

En collaboration avec l'équipe d'Olivier Espeli au Collège de France (Paris), nous avons mis en évidence que le site *dif* est un site de fixation et de clivage préférentiel pour la TopoIV. Nous avons constaté qu'une inactivation partielle de la TopoIV est plus préjudiciable lorsque l'on inactive un ou plusieurs composants du système de recombinaison spécifique de site XerCD/*dif* activé par FtsK, notamment lors de l'inactivation de XerC, ce qui suggère un rôle spécifique de XerC dans le contrôle de l'activité de la TopoIV au niveau du site *dif*. Ce contrôle de la TopoIV par XerC semble se faire via une interaction directe entre le domaine C-terminal de la sous-unité ParC de la TopoIV et XerC.

En plus du rôle de XerC, et de la recombinaison XerCD/*dif*, activée par FtsK, nous avons mis en évidence que MatP, soit en elle-même, ou soit via son activité d'organisation de la région terminale du chromosome, était importante pour l'activité de la TopoIV au niveau du site *dif*.

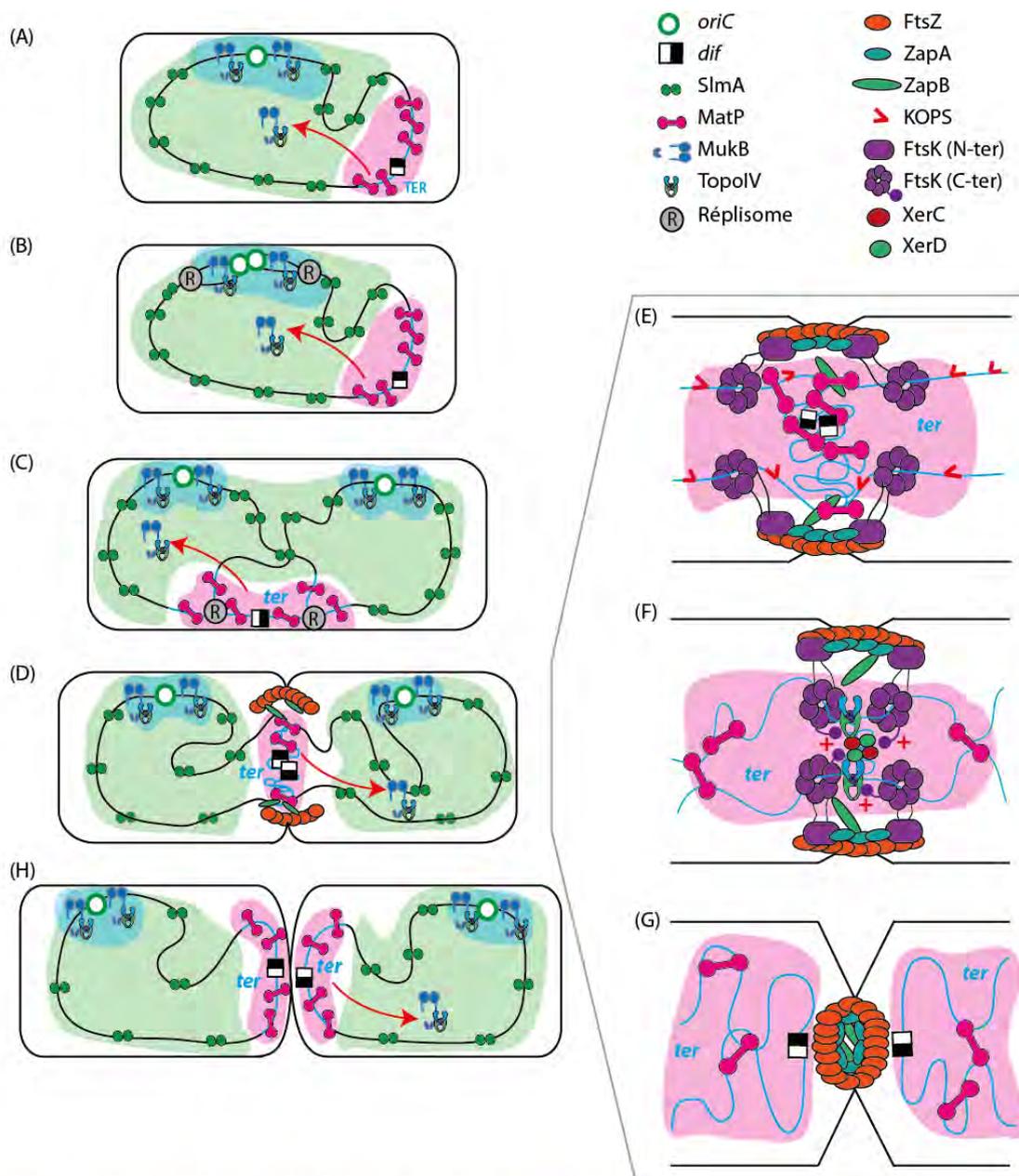


Figure 64 : La région *ter* : un acteur central dans le positionnement du chromosome, la ségrégation et le contrôle de la division cellulaire

(A) Dans les cellules nouvellement nées, la région Ori est située au centre de la cellule et la région *ter* au nouveau pôle. MatP colocalise avec *ter* et provoque la dissociation du complexe MukBEF de *ter*. MukBEF interagit avec la TopoIV, et colocalise avec *oriC*. (B) Après répllication, les deux *oriC* restent cohésives. (C) Elles sont ensuite ségréguées et se localisent aux positions 1/4 et 3/4. *ter* migre au centre de la cellule avant répllication. (D) Après répllication, les régions *ter* sont maintenues au centre grâce aux interactions MatP-MatP et MatP-ZapB. (E) Cela permet de créer une zone de chargement préférentielle pour FtsK. (F) FtsK transloque l'ADN en direction des sites *dif* grâce à la reconnaissance des KOPS. FtsK nettoie l'ADN de toutes les protéines, notamment MatP, permettant la ségrégation orientée et progressive de *ter*. Les liens d'intercaténation persistants au niveau de *ter* sont résolus par la TopoIV, activée par XerC. FtsK active la recombinaison XerCD à *dif*, permettant la résolution des dimères. (G) Après résolution des liens d'intercaténation et des dimères, les chromosomes sont ségrégués dans les deux futures cellules filles, et il y a fermeture du septum. (H) On obtient deux cellules filles parfaitement identiques, avec *oriC* localisé au centre et *ter* au nouveau pôle de la cellule.

2. Modèle

La région ter : un acteur central dans le positionnement du chromosome, la ségrégation et le contrôle de la division cellulaire »

2.1. En présence de MatP

Les données de la littérature ainsi que les résultats obtenus pendant ma thèse permettent de mettre en évidence le rôle central de la région terminale du chromosome dans différentes étapes clés du cycle cellulaire : le positionnement intracellulaire du chromosome, la ségrégation du chromosome ainsi que le contrôle de la division cellulaire via la protéine d'occlusion par le nucléoïde SImA. Le modèle proposé est le suivant (Figure 64) :

- Dans les cellules nouvellement nées, la région terminale du chromosome est localisée à proximité du nouveau pôle de la cellule, et l'origine de réplication *oriC* est située au centre de la cellule. La présence de MatP sur les sites *matS*, au nombre de 23 dans la région *ter*, provoque la dissociation de MukB, en complexe avec MukE et MukF de la région *ter*, et favorise l'association du complexe MukBEF au niveau d'*oriC*. Cette relocalisation nécessite la fixation et l'hydrolyse d'ATP par MukB. MukB interagit avec la TopoIV via le domaine C-terminal de la sous-unité ParC. Cette interaction favorise la présence de la TopoIV au niveau d'*oriC* (Figure 64A).
- Lors de l'initiation de la réplication à *oriC*, MukBEF et la TopoIV restent préférentiellement localisées dans la région Ori, permettant ainsi la résolution des caténanes à l'arrière des fourches de réplication, après une période de cohésion post-répllicative courte. La zone autour d'*oriC* est une zone où il y a une forte activité de décaténation, et donc une période de cohésion post-répllicative courte. (Figure 64B)
- Après cette courte période de cohésion post-répllicative, on observe une migration très précise des deux régions autour d'*oriC*, au niveau des positions 1/4 et 3/4 de la cellule. La présence de MukB est essentielle à ce positionnement précis. On connaît le rôle de

MukB dans le relâchement de la cohésion post-réplivative via le positionnement et le contrôle de l'activité de la TopoIV, mais on ne sait toutefois pas encore comment MukB permet de localiser les *oriC* aux positions 1/4 et 3/4 de manière active. La migration des *oriC* aux positions 1/4 et 3/4 s'accompagne d'une relocalisation de la région *ter* du chromosome au centre de la cellule, avant même sa réplication (Figure 64C).

- Les deux régions *ter* nouvellement répliquées ne sont pas ségréguées au fur et à mesure de la réplication, mais après une période de cohésion post-réplivative étendue. Cette période de cohésion post-réplivative étendue est due au fait que MatP provoque la dissociation de MukB de la région *ter*, ce qui entraîne un déficit de TopoIV au niveau de la région *ter*, et donc une persistance des précaténanes en amont des fourches de réplication, uniquement au niveau de la région *ter* du chromosome, mais aussi aux interactions MatP-MatP, qui permettent de ponter deux sites *matS* distants, présents sur la même molécule d'ADN (ce qui provoque la compaction de la région *ter*) ou sur deux molécules d'ADN différentes (ce qui provoque de la cohésion). De plus, on note qu'il y a mise en place de l'anneau Z, et recrutement des protéines du divisome, alors que la région *ter* n'est pas encore ségréguée. Le « *Ter Linkage* » (= la chaîne d'interaction ADN-MatP-ZapB-ZapA-FtsZ) semble jouer un rôle central à la fois dans la régulation positive de la mise en place de l'anneau Z au centre de la cellule ainsi que dans le maintien de la région *ter* au centre de la cellule après sa réplication (Figure 64D).
- La présence de MatP sur la région *ter*, ainsi que la présence de la région *ter* à proximité du divisome permet un chargement préférentiel d'FtsK au niveau de cette région. FtsK est localisée au centre de la cellule grâce à son domaine N-terminal qui fait partie du divisome. Les sous-domaines α et β du domaine C-terminal de FtsK hexamérisent autour de l'ADN, et permettent la translocation de l'ADN. La reconnaissance des KOPS par le sous-domaine γ de FtsK permet d'orienter la translocation en direction des sites *dif*, et donc des extrémités de la région *ter* vers le centre de cette région (Figure 64E).
- La translocation de FtsK sur l'ADN entraîne le décrochage de toutes les protéines qui sont liées à l'ADN au niveau de la région *ter*, et entraîne donc le décrochage de MatP. C'est cette activité de nettoyage de FtsK qui permet une ségrégation ordonnée et

progressive de la région *ter*, en enlevant progressivement les interactions MatP-MatP et MatP-ZapB qui maintiennent les deux régions *ter* compactes et cohésives. La translocation de FtsK en direction des sites *dif* et le déficit de TopoIV dû à la dissociation de MukBEF de la région *ter* par MatP entraîneraient une accumulation de liens d'intercaténation entre les deux chromosomes frères à proximité du site *dif*. Le site *dif* est un site de fixation et de clivage préférentiel pour la TopoIV, et la recombinaison XerCD/*dif* activée par FtsK semble jouer un rôle essentiel dans l'activité de la TopoIV à *dif* et donc dans la résolution des liens d'intercaténations. Ce contrôle de l'activité de la TopoIV par la recombinaison XerCD/*dif* activée par FtsK semble se faire via un contact direct entre la sous-unité ParC de la TopoIV et la recombinase XerC (Figure 64F).

- Dans une partie de la population, un dimère de chromosome peut être formé suite à un nombre impair d'évènements de recombinaison homologue permettant la réparation des cassures de l'ADN. La résolution des dimères de chromosomes nécessite les recombinases spécifiques de site XerC et XerD, qui agissent au niveau du site *dif*. Le sous-domaine γ de FtsK est essentiel à la résolution des dimères de chromosome puisqu'il permet d'activer le couple de recombinases XerD, qui catalysent un premier échange de brins conduisant à la formation d'une jonction de Holliday. La jonction de Holliday peut ensuite être résolue grâce à second échange de brins catalysé par le couple de recombinases XerC (Figure 64F).
- La résolution des liens d'intercaténation par la TopoIV ainsi que la résolution des dimères de chromosome par la recombinaison spécifique de site XerCD/*dif* activée par FtsK sont essentielles à la ségrégation des deux chromosomes frères dans les deux futures cellules filles. La fermeture de septum de division intervient à la fin de cycle cellulaire, lorsque les deux types de liens liant les chromosomes frères sont résolus et qu'ils peuvent donc être ségrégés (Figure 64F).
- Juste avant la séparation des deux cellules filles par les amidases, les deux chromosomes frères ont la même position et la même orientation que dans les cellules nouvellement nées (Figure 64H).

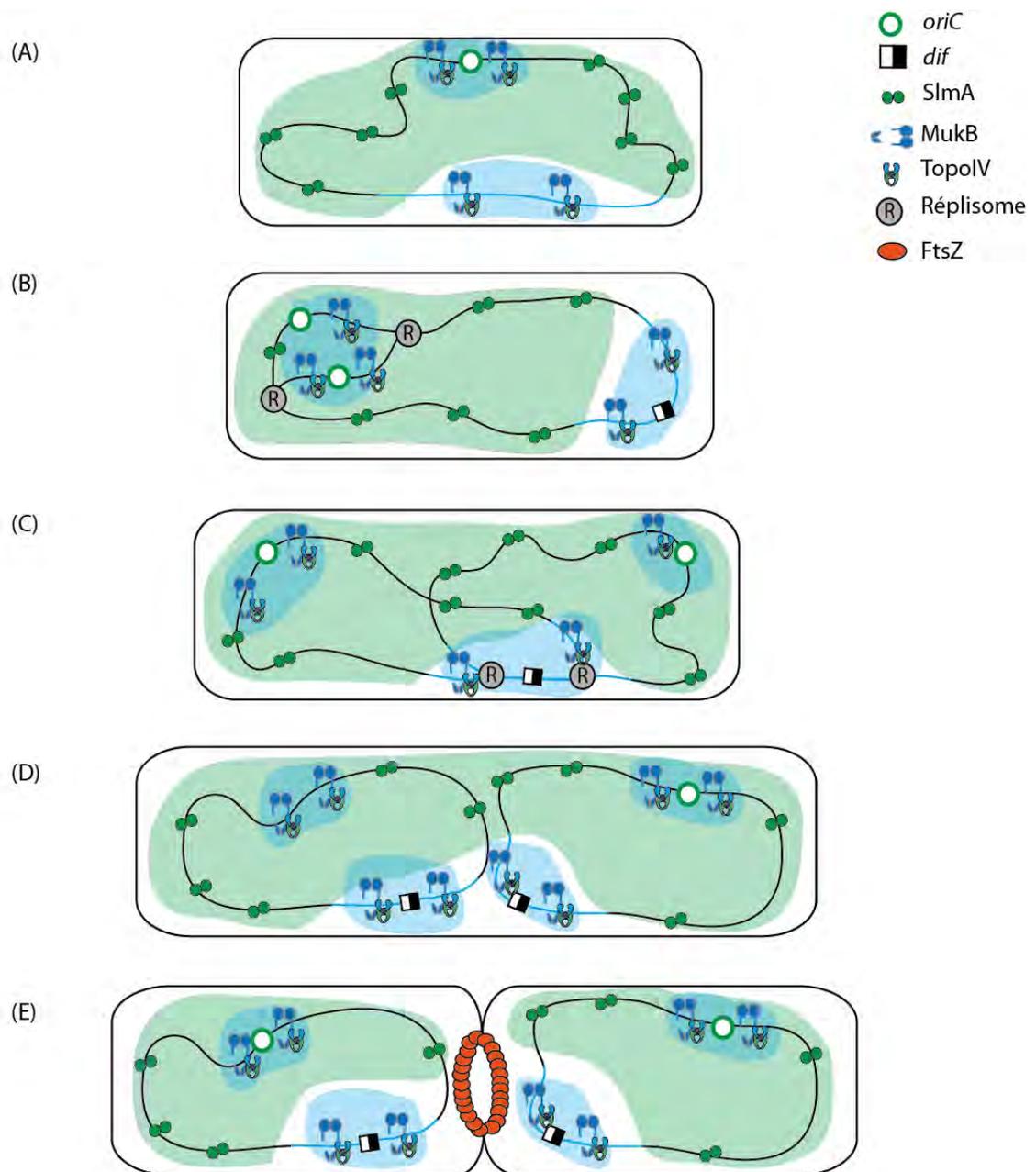


Figure 65 : Effets de l'absence de MatP sur le positionnement, la ségrégation du chromosome et le contrôle de la division cellulaire

(A) En absence de MatP, MukBEF colocalise avec la région *ter* ainsi qu'avec *oriC*. *ter* n'est plus localisé au nouveau pôle de la cellule et *oriC* n'est plus au centre. (B) L'absence de MatP ne semble pas modifier le timing de réplication du chromosome. (C) La réplication de *ter* n'a plus lieu précisément au centre de la cellule comme dans une souche sauvage. (D) La ségrégation de la région *ter* suit la réplication. Il n'y a plus de cohésion post-répllicative étendue comme en présence de MatP. Cette ségrégation précoce entraîne un changement de positionnement et d'orientation du chromosome, ce qui entraîne un retard de division cellulaire, dû à la présence de SImA au centre de la cellule. (E) La cellule continue son élongation jusqu'à ce que les deux chromosomes frères se retrouvent suffisamment séparés pour que l'anneau Z puisse se mettre en place au centre de la cellule.

2.2. En absence de MatP

L'absence de MatP semble avoir des conséquences sur le positionnement global et l'orientation de tout le chromosome, et pas uniquement de la région terminale du chromosome. Cette désorganisation globale a des conséquences sur la ségrégation du chromosome, mais aussi sur la division cellulaire. Le modèle proposé est le suivant (Figure 65) :

- Dans les cellules nouvellement nées, les régions Ori et *ter* ont une localisation moins précise que dans la souche sauvage. MatP étant absent, MukB, en complexe avec MukE et MukF, se localise préférentiellement au niveau de la région *ter*, possédant des sites *matS* mais aussi à proximité d'*oriC*, comme dans la souche sauvage. MukB interagit avec la TopoIV, via le domaine C-terminal de ParC, quelle que soit sa localisation dans la cellule (Figure 65A).
- L'absence de MatP ne modifie ni l'initiation de la réplication, ni l'élongation de la réplication (Figure 65B).
- Contrairement à la souche sauvage où la région *ter* présente une cohésion post-répllicative étendue après sa réplication, on observe une ségrégation précoce de la région *ter* en absence de MatP. Cette ségrégation précoce semble être due à la fois au relâchement précoce de la cohésion post-répllicative par la TopoIV, très présente au niveau de *ter* du fait de son interaction avec MukB et de la localisation préférentielle de MukB au centre de la cellule, mais aussi à l'absence d'interactions MatP-ZapB et MatP-MatP permettant le pontage entre deux sites *matS* distants, appartenant ou non à la même molécule d'ADN (Figure 65C).
- Cette ségrégation précoce de la région *ter* semble avoir pour conséquence une désorganisation de l'ensemble du chromosome, qui se traduit par une perte de l'orientation du chromosome et une perte du positionnement précis du chromosome dans la cellule. Les régions non-*ter* possèdent des sites SBS, sur lesquels la protéine d'occlusion par le nucléoïde SImA vient se fixer. La désorganisation globale du

chromosome a pour conséquence la présence de SlmA au centre de la cellule, même après la réplication et la ségrégation de l'ensemble du chromosome, ce qui inhibe la formation de l'anneau Z, et entraîne donc un retard de division cellulaire (Figure 65D).

- La division cellulaire ne pouvant avoir lieu, la cellule continue à s'allonger, parfois jusqu'à former des filaments (cellules de taille supérieure à 7 μ m en condition de croissance rapide). Au bout d'un certain temps, il est possible que les chromosomes frères se retrouvent assez éloignés l'un de l'autre, pour qu'une zone dépourvue de SlmA se forme au centre de la cellule, permettant la mise en place de l'anneau Z, le recrutement des protéines du divisome, et la fermeture du septum. Les cellules filles ainsi formées ont donc une taille plus grande que les cellules filles dans une souche sauvage (Figure 65E).

3. Discussion et perspectives

3.1. MatP, l'orientation du chromosome et le contrôle de la division cellulaire

- MatP et l'orientation du chromosome

Mes travaux de thèse ont permis de mettre en évidence que MatP ne jouait pas uniquement un rôle dans l'organisation, la compaction et la localisation de la région terminale du chromosome d'*E. coli*, mais jouait un rôle bien plus global dans l'organisation générale du chromosome à différentes étapes du cycle cellulaire. Nous avons notamment constaté que l'orientation du chromosome était perdue dans les cellules pré-divisionnelles en absence de MatP. Chez de nombreuses bactéries, l'orientation du chromosome dans la cellule est dépendante de la présence d'un système ParABS, qui permet de localiser les deux origines de réplication *oriC* dans les deux futures cellules filles, et de la présence de protéines de type SMC intervenant dans la condensation des loci autour d'*oriC*.

Dans le cas d'*E. coli*, aucun système ParABS n'a pour l'instant été mis en évidence. Nos résultats, couplés aux résultats obtenus dans l'équipe de D. Sherratt et publiés cette année (Nolivos et al., 2016), suggèrent que l'orientation du chromosome chez *E. coli* est principalement contrôlée par la région terminale du chromosome, et donc par la protéine MatP, qui est l'acteur majeur de la dynamique de la région *ter*. MatP pourrait contrôler l'orientation du chromosome à la fois (i) en excluant le complexe MukBEF de la région *ter*, ce qui favoriserait son association avec le reste du chromosome, et notamment la région origine mais aussi (ii) en excluant les régions non-*ter* du centre de la cellule, par exemple par un phénomène d'encombrement stérique.

Afin de déterminer quelles sont les implications respectives de l'exclusion de MukBEF de la région *ter*, de l'interaction MatP-MatP ainsi que de l'interaction MatP-ZapB dans le contrôle de l'orientation du chromosome, il semble important de pouvoir dissocier ces différentes fonctions. Le problème, à l'heure actuelle, est que nous ne connaissons pas précisément les

résidus impliqués dans les interactions avec MukB, ZapB ou avec MatP elle-même. Nous savons que le domaine « *coiled-coil* » C-terminal est impliqué à la fois dans la tétramérisation de MatP, essentielle au pontage de deux sites *matS* distants et donc à la compaction et à la cohésion de la région *ter*, ainsi que dans les interactions avec ZapB, essentielles à la localisation de la région *ter* au centre de la cellule. Le mutant *matP* Δ C20 (délétion des 20 derniers acides aminés de MatP, qui correspondent au domaine « *coiled-coil* ») abolit donc à la fois la tétramérisation et l'interaction avec ZapB. Pour découpler les effets des interactions MatP-MatP et MatP-ZapB il semble judicieux de trouver un mutant de ZapB pouvant toujours interagir avec ZapA, et donc se localiser au septum, mais n'interagissant plus avec MatP, sachant que l'on sait déjà que ZapB interagit avec ZapA via son domaine N-terminal et avec MatP via son domaine C-terminal (Espeli et al., 2012).

Il a précédemment été mis en évidence la présence de 4 résidus hydrophobes essentiels à la tétramérisation de MatP (Dupaigne et al., 2012). Cependant, le remplacement de ces 4 résidus hydrophobes par 4 glycines ne permet plus la formation du domaine « *coiled-coil* », ce qui a effectivement comme conséquence d'empêcher la tétramérisation de MatP, mais qui peut aussi avoir comme conséquence d'abolir les interactions entre MatP et ZapB, étant donné que MatP interagit avec ZapB via son domaine « *coiled-coil* ».

Concernant l'interaction entre MatP et MukB, permettant la dissociation de MukBEF de la région *ter*, et favorisant donc sa liaison avec le reste du chromosome, elle ne se ferait pas au niveau du domaine C-terminal de MatP (Nolivos et al., 2016), mais soit au niveau du domaine « *4-helix bundle* » N-terminal, soit au niveau de la région centrale RHH. Ces deux régions étant aussi impliquées dans la fixation de MatP sur les sites *matS* ainsi que dans la dimérisation de MatP, il est impossible de les déléter sans affecter aussi ces activités. De même, le domaine « *hinge* » de MukB ne peut être délété pour étudier les conséquences d'une perte de l'interaction MatP-MukB puisqu'il est essentiel à la formation des dimères de MukB mais aussi puisqu'il semble impliqué à la fois dans l'interaction avec MatP, mais aussi dans l'interaction avec la sous-unité ParC de la TopoIV.

Afin de poursuivre cette étude, il est donc essentiel de rechercher d'autres mutants permettant de distinguer les différentes activités de MatP (interactions MatP-MatP, MatP-

ZapB et MatP-MukB) et de mettre au point des expériences permettant de voir les effets de la perte d'une seule de ces activités.

- [MatP et le contrôle de la division cellulaire](#)

Nous avons montré qu'une des conséquences directes de la perte de positionnement du chromosome en absence de MatP est un retard de division cellulaire dû à la présence plus fréquente de régions non-*ter* au centre de la cellule dans les cellules pré-divisionnelles, et donc à la présence plus fréquente de SlmA, liée aux sites SBS, au centre de la cellule. Lorsque SlmA est au centre de la cellule, il y a inhibition de la formation de l'anneau Z et donc retard dans la mise en place du septum de division.

De plus, il a récemment été montré que la mise en place de l'anneau Z n'était pas uniquement régulée négativement par les systèmes MinCDE et SlmA, mais était aussi régulée positivement par le « *Ter Linkage* » (Bailey et al., 2014) (voir partie 3.1.3.1). La région terminale du chromosome servirait ainsi de marqueur positif pour la mise en place de l'anneau Z, en présence de ZapA, ZapB et MatP. Donc le « *Ter Linkage* » permettrait dans un premier temps de favoriser la mise en place de l'anneau Z à proximité immédiate de la région *ter*, puis dans un second temps de maintenir la région *ter* à proximité immédiate de l'anneau Z, et donc aussi des autres protéines du divisome.

L'absence de MatP aurait donc un double effet négatif sur la mise en place de l'anneau Z. Dans un premier temps, la perte d'orientation du chromosome aurait pour conséquence la présence de SlmA, un des deux régulateurs négatifs de la mise en place de l'anneau Z, au centre de la cellule, ce qui inhiberait la mise en place de l'anneau Z au futur site de division. Dans un second temps, l'absence de MatP et donc l'absence du « *Ter Linkage* » pourrait retarder la stabilisation de l'anneau Z. En effet, dans une souche sauvage, la présence de MatP au centre de la cellule au moment de sa réplication favoriserait la présence de ZapB, et de ZapA au centre, permettant la stabilisation de l'anneau Z lors de sa formation au futur site de division.

Ce double effet de la délétion de MatP pourrait expliquer le fait que la suppression de l'augmentation de taille n'est pas complète dans le double mutant *matP- slmA-* comparé au mutant *slmA-*, en condition de croissance rapide (voir la figure 4 du manuscrit). En absence de SlmA seulement, on observe une diminution de la taille moyenne des cellules. SlmA étant un des deux régulateurs négatifs de la formation de l'anneau Z, il semble logique que l'absence de SlmA ait pour conséquence une mise en place plus précoce de l'anneau Z, et donc une division cellulaire plus précoce. Le fait que l'on constate très peu de mortalité cellulaire et peu de modification dans la répartition de taille des cellules en absence de SlmA suggère que le « *Ter Linkage* » permettrait, en absence de SlmA, de réguler positivement la formation de l'anneau Z à proximité immédiate de la région *ter*, et donc au centre de la cellule, limitant ainsi le guillotinage des régions non-*ter* du chromosome. En absence de MatP et de SlmA, l'anneau Z pourrait se former, comme en absence de SlmA seule, plus précocement que dans une souche sauvage. En revanche, l'absence de MatP, et donc du « *Ter Linkage* » ne permettrait pas de stabiliser correctement l'anneau Z au centre de la cellule, ce qui expliquerait le retard de division cellulaire, et donc l'allongement des cellules, observé lors de la délétion de MatP et de SlmA comparée à la délétion de SlmA seule.

- [MatP et la ségrégation du chromosome](#)

L'idée d'un rôle prépondérant de MatP dans le contrôle du comportement du chromosome pendant les différentes étapes du cycle cellulaire est renforcée par la mise en évidence d'une interconnexion entre MatP et MukB. MukB participe (i) au relâchement de la cohésion post-réplivative via l'activité de la TopoIV et (ii) au positionnement des origines de réplication *oriC* aux positions 1/4 et 3/4. MatP, quant à elle, contrôle la ségrégation de la région terminale du chromosome (i) en retardant la ségrégation de celle-ci via les interactions MatP-MatP et MatP-ZapB permettant le pontage de deux sites *matS* distants sur deux molécules d'ADN différentes et (ii) en créant un substrat préférentiel pour FtsK qui permet la ségrégation ordonnée et progressive de la région *ter* lorsque la translocation est orientée grâce à la reconnaissance des motifs KOPS (Stouf et al., 2013).

On sait maintenant que MatP provoque la dissociation du complexe MukBEF de la région *ter*, ce qui favorise son association avec la région Ori. Etant donné que la sous-unité ParC de

la TopoIV interagit avec MukB quelle que soit la position de MukBEF dans la cellule (Nolivos et al., 2016), la dissociation de MukBEF de la région *ter* par MatP semble avoir pour conséquence un déficit d'activité de la TopoIV au niveau de la région *ter*. Ce déficit d'activité de la TopoIV pourrait avoir comme conséquence une accumulation des précaténanes à l'arrière de la fourche de réplication, et serait donc responsable de la cohésion post-réplivative étendue de la région *ter*.

Le fait que la dissociation de MukBEF de la région *ter* semble favoriser son association à proximité de l'origine de réplication *oriC* suggère que MatP contrôle la ségrégation de la région Ori en favorisant la présence du complexe MukBEF et donc de la TopoIV à proximité d'*oriC*, mais aussi sur le reste du chromosome, et donc en favorisant le relâchement de la cohésion post-réplivative à l'arrière des fourches de réplication grâce à la résolution des précaténanes formés pendant la réplication. Il serait intéressant de comparer la durée de la période de cohésion post-réplivative de loci dans les différentes régions non-*ter* en absence de MatP afin de voir si la localisation préférentielle de MukBEF et donc de la TopoIV au niveau de la région *ter* retarde le relâchement de la cohésion post-réplivative de l'ensemble du chromosome, uniquement de la région Ori, ou bien n'a aucune conséquence sur la durée de la période de cohésion post-réplivative des régions autres que la région *ter*. C'est en partie ce que l'on a fait lorsque l'on a analysé la ségrégation d'un locus dans une région non-*ter* par rapport à la ségrégation d'un locus dans la région *ter*. Cependant, on sait que la ségrégation du locus dans *ter* est modifiée en absence de MatP, ce qui rend difficile la comparaison entre la souche sauvage et la souche *matP*⁻. Il serait donc intéressant de comparer la ségrégation de deux loci en dehors de la région *ter*, mais aussi de mesurer un temps de cohésion post-réplivative absolu, par exemple par rapport à l'initiation de la réplication.

Une interrogation majeure perdure concernant la ségrégation des origines de réplication *oriC* et MukB. En effet, on sait que MukB est impliquée dans la localisation des *oriC* après réplication aux positions 1/4 et 3/4 de la cellule, et que l'absence de MukB a pour conséquence une localisation plus polaire des *oriC*, mais on ne sait toujours pas quel mécanisme moléculaire permet de positionner les *oriC* à ces positions précises après le relâchement de leur cohésion post-réplivative par la TopoIV.

MatP jouerait donc un rôle central dans la ségrégation dans l'ensemble du chromosome, (i) en favorisant le relâchement de la cohésion post-réplivative des régions non-*ter* via le positionnement de MukBEF et de la TopoIV, (ii) en maintenant une période de cohésion post-réplivative étendue au niveau de la région *ter* via les interactions MatP-MatP impliquées dans la cohésion des régions *ter* nouvellement répliquées mais aussi (iii) en créant un déficit de TopoIV au niveau de la région *ter* par dissociation du complexe MukBEF.

- Les sites *matS* déplacés modifient le comportement des loci situés à proximité

Nous avons constaté, lors de l'analyse des souches possédant un seul site *matS* déplacé, soit dans la région Ori, soit dans la région Right, une modification du profil de ségrégation des loci situés à proximité immédiate du site *matS*, mais aussi un défaut de localisation cellulaire de la région d'insertion du site *matS*, ainsi qu'une modification de l'orientation du chromosome, au moins dans quelques cellules.

Ces modifications de l'organisation de chromosome au sein de la cellule ont pour conséquence une légère augmentation de la taille des cellules, probablement due à la présence plus fréquente de la région d'insertion du site *matS* au centre de la cellule dans les cellules pré-divisionnelles, et donc à la présence plus fréquente de SlmA au centre de la cellule, ce qui retarde la mise en place de l'anneau Z.

De nombreuses questions restent en suspens. Par exemple, nous avons observé une présence plus fréquente de la région d'insertion du site *matS* au centre de la cellule, après réplification et ségrégation de cette région. Cependant, les analyses ont été réalisées sur une population non synchronisée, et on ne peut pas savoir si la région d'insertion du site *matS* est présente plus fréquemment au centre uniquement au moment de la mise en place de l'anneau Z ou non. De plus, les analyses n'étant pas faites en vidéo-microscopie, nous ne pouvons pas savoir si la présence au centre de la cellule est un événement très transitoire dans la totalité des cellules de la population, ou bien un événement stable uniquement dans une partie des cellules de la population, ces deux hypothèses donnant le même type de résultats en analysant une population entière non synchronisée.

De plus, il serait intéressant de calculer la durée de la cohésion post-réplivative en présence ou en absence d'un site *matS*, afin de voir si la présence d'un seul site *matS* peut modifier la ségrégation des loci à proximité. Si la période de cohésion-post réplivative est modifiée en présence d'un site *matS*, nous allons être confronté de nouveau à un même problème : est-ce que cette modification est due à la capacité de MatP à ponter deux sites *matS* distants localisés sur deux molécules d'ADN différentes ou bien est-ce que cette modification est due à un déficit de présence de TopoIV à proximité du site *matS* à cause d'une dissociation du complexe MukBEF par MatP ?

Afin d'aller plus loin dans l'analyse des conséquences du déplacement d'un site *matS* en dehors de la région *ter*, il semble de nouveau nécessaire d'isoler des mutants « séparation de fonction » de MatP afin de pouvoir découpler les différentes activités de MatP.

Nos résultats semblent indiquer que la présence d'un site *matS* en dehors de la région *ter* a les mêmes conséquences que l'absence de MatP sur l'orientation du chromosome. Cependant, il est difficile d'envisager qu'une seule molécule de MatP fixée en dehors de *ter* puisse avoir des conséquences aussi importantes sur l'orientation globale de la totalité du chromosome. Il est plus probable que la région d'insertion du site *matS* soit fréquemment plus centrale que la région *ter* uniquement parce qu'elle est relocalisée au centre de la cellule plutôt que parce qu'il y a un changement d'orientation de l'ensemble du chromosome. Pour étudier cela, il serait intéressant de placer un site *parS* dans la région diamétralement opposée à la région d'insertion du site *matS*, par rapport à l'axe *oriC/dif* afin de voir si l'insertion d'un site *matS* dans Right par exemple, modifie la localisation des régions Right et Left dans la cellule (et donc l'orientation du chromosome) ou uniquement la localisation de la région Right (et donc ne provoque qu'une relocalisation de cette région stable ou transitoire).

De plus, nous disposons au laboratoires des souches possédant un site *matS* déplacé dans la région NS-Right. Cette région étant non structurée et présentant une localisation moins bien définie que les régions Right et Ori, il serait intéressant de voir quelles sont les conséquences de l'insertion d'un site *matS* dans cette région, et de les comparer aux conséquences de l'insertion d'un site *matS* dans Right ou dans Ori. De plus, il me semble

nécessaire de refaire les expériences avec un site *matS* déplacé dans Ori ou dans Right, afin de confirmer les résultats préliminaires obtenus.

Enfin, j'ai aussi construit pendant ma thèse des souches possédant deux sites *matS* dans les régions Ori, Right ou NS-Right. Il serait aussi intéressant d'analyser ces souches afin de voir si l'insertion de deux sites *matS* en dehors de la région *ter* a les mêmes conséquences que l'insertion d'un seul site *matS*.

3.2. La TopoIV, la résolution des liens d'intercaténation et la recombinaison XerCD/*dif*

En collaboration avec l'équipe d'O. Espeli, nous avons confirmé que le site *dif* est un site de fixation et de clivage préférentiel pour la TopoIV et que la recombinaison XerCD/*dif*, activée par FtsK, ainsi que MatP, jouent un rôle dans l'activité de la TopoIV au site *dif*.

Les résultats obtenus pendant ma thèse (*in vivo*) ainsi que les résultats obtenus par l'équipe d'O. Espeli (*in vivo* et *in vitro*) montrent une synergie entre l'activité de la TopoIV, et la recombinaison XerCD/*dif*, activée par FtsK, ce qui suggère que la recombinaison XerCD/*dif*, activée par FtsK, favorise l'activité de décaténation de la TopoIV.

Afin de vérifier que les effets observés sont bien dus au fait que la recombinaison XerCD/*dif* favorise l'activité de la TopoIV au niveau du site *dif*, et pas uniquement au fait que la recombinaison spécifique de site XerCD à *dif* puisse décaténer les chromosomes au moment de la résolution des dimères de chromosomes comme proposé précédemment (Grainge et al., 2007), plusieurs possibilités s'offrent à nous. Il est tout d'abord possible d'utiliser un mutant XerC^{RQ}, qui se fixe très bien au niveau du site *dif*, mais n'est plus capable de réaliser la réaction de coupure de l'ADN. Ce mutant peut nous permettre de voir si, en absence de recombinaison XerCD au niveau du site *dif*, on observe quand même une amélioration de la fixation et du clivage par la TopoIV à cet emplacement. De même, il est possible de remplacer le système XerCD/*dif* par le système XerS/*difSL* ou Cre/*loxP*, qui permettent la résolution des dimères de chromosome sans XerC. Si ces systèmes ne permettent pas de compenser une inactivation partielle de la TopoIV, cela signifie que la recombinaison spécifique de site n'est pas suffisante

pour résoudre les liens d'intercaténation et qu'une interaction directe entre le système de recombinaison XerCD/*dif* et la TopoIV est essentielle à l'activité de la TopoIV à *dif*.

Le fait que la fixation de la TopoIV au niveau du site *dif* soit améliorée par la présence de XerC *in vitro*, et que l'inactivation partielle de la TopoIV est plus préjudiciable en absence de XerC que de XerD ou du site *dif* suggèrent une interaction directe entre la recombinase XerC et la TopoIV. Pour vérifier cette hypothèse, il serait nécessaire de confirmer cette interaction directe *in vivo* et *in vitro* (double hybride bactérien, co-immunoprécipitation, *pull-down assays*...). Si l'hypothèse d'une interaction directe entre la TopoIV et XerC est confirmée par ces méthodes, il sera ensuite nécessaire de rechercher des mutants d'interaction afin de pouvoir analyser plus en détails les conséquences de cette interaction directe entre XerC et la TopoIV dans l'activité de décaténation de cette dernière, afin de savoir si XerC permet juste de localiser la TopoIV au niveau du site *dif*, ou si XerC améliore l'activité de décaténation de la TopoIV.

Une reconstruction *in vitro* de la réaction de décaténation, en utilisant des plasmides intercaténés possédant un site *dif*, de la TopoIV, XerC, XerD et FtsK purifiées, pourrait nous permettre de compléter cette étude. Enfin, une caractérisation temporelle de la coupure de la TopoIV au niveau du site *dif* (en utilisant des cellules synchronisées par exemple) nous permettrait de savoir à quel moment à lieu la résolution des liens d'intercaténation au cours du cycle cellulaire.

Références

- Adachi, S., Fukushima, T., Hiraga, S., 2008. Dynamic events of sister chromosomes in the cell cycle of *Escherichia coli*. *Genes Cells* 13, 181–197. doi:10.1111/j.1365-2443.2007.01157.x
- Adiciptaningrum, A., Osella, M., Moolman, M.C., Cosentino Lagomarsino, M., Tans, S.J., 2015. Stochasticity and homeostasis in the *E. coli* replication and division cycle. *Sci Rep* 5, 18261. doi:10.1038/srep18261
- Adler, H.I., Fisher, W.D., Cohen, A., Hardigree, A.A., 1967. MINIATURE *Escherichia coli* CELLS DEFICIENT IN DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 57, 321–326.
- Anderson, D.E., Gueiros-Filho, F.J., Erickson, H.P., 2004. Assembly dynamics of FtsZ rings in *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli* and effects of FtsZ-regulating proteins. *Journal of Bacteriology* 186, 5775–5781. doi:10.1128/JB.186.17.5775-5781.2004
- Aussel, L., Barre, F.-X., Aroyo, M., Stasiak, A., Stasiak, A.Z., Sherratt, D., 2002. FtsK is a DNA motor protein that activates chromosome dimer resolution by switching the catalytic state of the XerC and XerD recombinases. *Cell* 108, 195–205.
- Bach, T., Krekling, M.A., Skarstad, K., 2003. Excess SeqA prolongs sequestration of *oriC* and delays nucleoid segregation and cell division. *The EMBO Journal* 22, 315–323. doi:10.1093/emboj/cdg020
- Bachellier, S., Clément, J.M., Hofnung, M., 1999. Short palindromic repetitive DNA elements in enterobacteria: a survey. *Res. Microbiol.* 150, 627–639.
- Bachellier, S., Saurin, W., Perrin, D., Hofnung, M., Gilson, E., 1994. Structural and functional diversity among bacterial interspersed mosaic elements (BIMEs). *Mol Microbiol* 12, 61–70.
- Badrinarayanan, A., Lesterlin, C., Reyes-Lamothe, R., Sherratt, D., 2012a. The *Escherichia coli* SMC complex, MukBEF, shapes nucleoid organization independently of DNA replication. *Journal of Bacteriology* 194, 4669–4676. doi:10.1128/JB.00957-12
- Badrinarayanan, A., Reyes-Lamothe, R., Uphoff, S., Leake, M.C., Sherratt, D.J., 2012b. In vivo architecture and action of bacterial structural maintenance of chromosome proteins. *Science* 338, 528–531. doi:10.1126/science.1227126
- Bailey, M.W., Bisicchia, P., Warren, B.T., Sherratt, D.J., Männik, J., 2014. Evidence for divisome localization mechanisms independent of the Min system and SlmA in *Escherichia coli*. *PLoS Genet* 10, e1004504. doi:10.1371/journal.pgen.1004504
- Bastia, D., Zzaman, S., Krings, G., Saxena, M., Peng, X., Greenberg, M.M., 2008. Replication termination mechanism as revealed by Tus-mediated polar arrest of a sliding helicase. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105, 12831–12836. doi:10.1073/pnas.0805898105
- Bates, D., Kleckner, N., 2005. Chromosome and replisome dynamics in *E. coli*: loss of sister cohesion triggers global chromosome movement and mediates chromosome segregation. *Cell* 121, 899–911. doi:10.1016/j.cell.2005.04.013
- Bergerat, A., de Massy, B., Gadelle, D., Varoutas, P.C., Nicolas, A., Forterre, P., 1997. An atypical topoisomerase II from Archaea with implications for meiotic recombination. *Nature* 386, 414–417. doi:10.1038/386414a0
- Bergler, H., Högenauer, G., Turnowsky, F., 1992. Sequences of the *envM* gene and of two mutated alleles in *Escherichia coli*. *J. Gen. Microbiol.* 138, 2093–2100. doi:10.1099/00221287-138-10-2093

- Bernhardt, T.G., de Boer, P.A.J., 2005. SImA, a nucleoid-associated, FtsZ binding protein required for blocking septal ring assembly over Chromosomes in *E. coli*. *Molecular Cell* 18, 555–564. doi:10.1016/j.molcel.2005.04.012
- Bernhardt, T.G., de Boer, P.A.J., 2003. The *Escherichia coli* amidase AmiC is a periplasmic septal ring component exported via the twin-arginine transport pathway. *Mol Microbiol* 48, 1171–1182. doi:10.1046/j.1365-2958.2003.03504.x
- Bigot, S., Corre, J., Louarn, J.-M., Cornet, F., Barre, F.-X., 2004. FtsK activities in Xer recombination, DNA mobilization and cell division involve overlapping and separate domains of the protein. *Mol Microbiol* 54, 876–886. doi:10.1111/j.1365-2958.2004.04335.x
- Bigot, S., Marians, K.J., 2010. DNA chirality-dependent stimulation of topoisomerase IV activity by the C-terminal AAA+ domain of FtsK. *Nucleic Acids Research* 38, 3031–3040. doi:10.1093/nar/gkp1243
- Bigot, S., Saleh, O.A., Cornet, F., Allemand, J.-F., Barre, F.-X., 2006. Oriented loading of FtsK on KOPS. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 13, 1026–1028. doi:10.1038/nsmb1159
- Bigot, S., Saleh, O.A., Lesterlin, C., Pagès, C., Karoui, El, M., Dennis, C., Grigoriev, M., Allemand, J.-F., Barre, F.-X., Cornet, F., 2005. KOPS: DNA motifs that control *E. coli* chromosome segregation by orienting the FtsK translocase. *The EMBO Journal* 24, 3770–3780. doi:10.1038/sj.emboj.7600835
- Bisicchia, P., Steel, B., Mariam Debela, M.H., Löwe, J., Sherratt, D., 2013. The N-terminal membrane-spanning domain of the *Escherichia coli* DNA translocase FtsK hexamerizes at midcell. *mBio* 4, e00800–13. doi:10.1128/mBio.00800-13
- Blakely, G., Colloms, S., May, G., Burke, M., Sherratt, D., 1991. *Escherichia coli* XerC recombinase is required for chromosomal segregation at cell division. *New Biol.* 3, 789–798.
- Blakely, G., May, G., McCulloch, R., Arciszewska, L.K., Burke, M., Lovett, S.T., Sherratt, D.J., 1993. Two related recombinases are required for site-specific recombination at dif and cer in *E. coli* K12. *Cell* 75, 351–361.
- Blakely, G.W., Davidson, A.O., Sherratt, D.J., 2000. Sequential strand exchange by XerC and XerD during site-specific recombination at dif. *J. Biol. Chem.* 275, 9930–9936.
- Blakely, G.W., Davidson, A.O., Sherratt, D.J., 1997. Binding and cleavage of nicked substrates by site-specific recombinases XerC and XerD. *Journal of Molecular Biology* 265, 30–39. doi:10.1006/jmbi.1996.0709
- Blakely, G.W., Sherratt, D.J., 1994. Interactions of the site-specific recombinases XerC and XerD with the recombination site dif. *Nucleic Acids Research* 22, 5613–5620.
- Boccard, F., Prentki, P., 1993. Specific interaction of IHF with RIBs, a class of bacterial repetitive DNA elements located at the 3' end of transcription units. *The EMBO Journal* 12, 5019–5027.
- Bramhill, D., 1997. Bacterial cell division. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 13, 395–424. doi:10.1146/annurev.cellbio.13.1.395
- Brendler, T., Austin, S., 1999. Binding of SeqA protein to DNA requires interaction between two or more complexes bound to separate hemimethylated GATC sequences. *The EMBO Journal* 18, 2304–2310. doi:10.1093/emboj/18.8.2304
- Brendler, T., Sawitzke, J., Sergueev, K., Austin, S., 2000. A case for sliding SeqA tracts at anchored replication forks during *Escherichia coli* chromosome replication and segregation. *The EMBO Journal* 19, 6249–6258. doi:10.1093/emboj/19.22.6249
- Brézellec, P., Hoebeke, M., Hiet, M.-S., Pasek, S., Ferat, J.-L., 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. doi:10.1093/bioinformatics/btl336
- Britton, R.A., Lin, D.C., Grossman, A.D., 1998. Characterization of a prokaryotic SMC protein involved in chromosome partitioning. *Genes & Development* 12, 1254–1259.
- Buddelmeijer, N., Beckwith, J., 2004. A complex of the Escherichia coli cell division proteins FtsL, FtsB and FtsQ forms independently of its localization to the septal region. *Mol Microbiol* 52, 1315–1327. doi:10.1111/j.1365-2958.2004.04044.x
- Buddelmeijer, N., Judson, N., Boyd, D., Mekalanos, J.J., Beckwith, J., 2002. YgbQ, a cell division protein in Escherichia coli and Vibrio cholerae, localizes in codependent fashion with FtsL to the division site. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99, 6316–6321. doi:10.1073/pnas.092128499
- Cabré, E.J., Monterroso, B., Alfonso, C., Sánchez-Gorostiaga, A., Reija, B., Jiménez, M., Vicente, M., Zorrilla, S., Rivas, G., 2015. The Nucleoid Occlusion SlmA Protein Accelerates the Disassembly of the FtsZ Protein Polymers without Affecting Their GTPase Activity. *PLoS ONE* 10, e0126434. doi:10.1371/journal.pone.0126434
- Calhoun, L.N., Kwon, Y.M., 2011. Structure, function and regulation of the DNA-binding protein Dps and its role in acid and oxidative stress resistance in Escherichia coli: a review. *J. Appl. Microbiol.* 110, 375–386. doi:10.1111/j.1365-2672.2010.04890.x
- Camara, J.E., Breier, A.M., Brendler, T., Austin, S., Cozzarelli, N.R., Crooke, E., 2005. Hda inactivation of DnaA is the predominant mechanism preventing hyperinitiation of Escherichia coli DNA replication. *EMBO Rep.* 6, 736–741. doi:10.1038/sj.embor.7400467
- Campbell, J.L., 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.
- Carson, M.J., Barondess, J., Beckwith, J., 1991. The FtsQ protein of Escherichia coli: membrane topology, abundance, and cell division phenotypes due to overproduction and insertion mutations. *Journal of Bacteriology* 173, 2187–2195.
- Cassler, M.R., Grimwade, J.E., Leonard, A.C., 1995. Cell cycle-specific changes in nucleoprotein complexes at a chromosomal replication origin. *The EMBO Journal* 14, 5833–5841.
- Cattoni, D.I., Chara, O., Godefroy, C., Margeat, E., Trigueros, S., Milhiet, P.-E., Nöllmann, M., 2013. SpoIIIE mechanism of directional translocation involves target search coupled to sequence-dependent motor stimulation. *EMBO Rep.* 14, 473–479. doi:10.1038/embor.2013.39
- Ceci, P., Cellai, S., Falvo, E., Rivetti, C., Rossi, G.L., Chiancone, E., 2004. DNA condensation and self-aggregation of Escherichia coli Dps are coupled phenomena related to the properties of the N-terminus. *Nucleic Acids Research* 32, 5935–5944. doi:10.1093/nar/gkh915
- Champoux, J.J., 2001. DNA topoisomerases: structure, function, and mechanism. *Annu. Rev. Biochem.* 70, 369–413. doi:10.1146/annurev.biochem.70.1.369
- Chargaff, E., 1950. Chemical specificity of nucleic acids and mechanism of their enzymatic degradation. *Experientia* 6, 201–209.
- Cho, H., Bernhardt, T.G., 2013. Identification of the SlmA active site responsible for blocking bacterial cytokinetic ring assembly over the chromosome. *PLoS Genet* 9, e1003304. doi:10.1371/journal.pgen.1003304
- Cho, H., McManus, H.R., Dove, S.L., Bernhardt, T.G., 2011. Nucleoid occlusion factor SlmA is

- a DNA-activated FtsZ polymerization antagonist. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108, 3773–3778. doi:10.1073/pnas.1018674108
- Choi, S., Ohta, S., Ohtsubo, E., 2003. A novel IS element, IS621, of the IS110/IS492 family transposes to a specific site in repetitive extragenic palindromic sequences in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* 185, 4891–4900. doi:10.1128/JB.185.16.4891-4900.2003
- Clément, J.M., Wilde, C., Bachellier, S., Lambert, P., Hofnung, M., 1999. IS1397 is active for transposition into the chromosome of *Escherichia coli* K-12 and inserts specifically into palindromic units of bacterial interspersed mosaic elements. *Journal of Bacteriology* 181, 6929–6936.
- Coskun-Ari, F.F., Hill, T.M., 1997. Sequence-specific interactions in the Tus-Ter complex and the effect of base pair substitutions on arrest of DNA replication in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 272, 26448–26456.
- Cox, M.M., Goodman, M.F., Kreuzer, K.N., Sherratt, D.J., Sandler, S.J., Mariani, K.J., 2000. The importance of repairing stalled replication forks. *Nature* 404, 37–41. doi:10.1038/35003501
- Crozat, E., Grainge, I., 2010. FtsK DNA translocase: the fast motor that knows where it's going. *Chembiochem* 11, 2232–2243. doi:10.1002/cbic.201000347
- Crozat, E., Meglio, A., Allemand, J.-F., Chivers, C.E., Howarth, M., Vénien-Bryan, C., Grainge, I., Sherratt, D.J., 2010. Separating speed and ability to displace roadblocks during DNA translocation by FtsK. *The EMBO Journal* 29, 1423–1433. doi:10.1038/emboj.2010.29
- Cui, Y., Petrushenko, Z.M., Rybenkov, V.V., 2008. MukB acts as a macromolecular clamp in DNA condensation. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 15, 411–418. doi:10.1038/nsmb.1410
- Dajkovic, A., Lan, G., Sun, S.X., Wirtz, D., Lutkenhaus, J., 2008. MinC spatially controls bacterial cytokinesis by antagonizing the scaffolding function of FtsZ. *Curr. Biol.* 18, 235–244. doi:10.1016/j.cub.2008.01.042
- Dame, R.T., Luijsterburg, M.S., Krin, E., Bertin, P.N., Wagner, R., Wuite, G.J.L., 2005. DNA bridging: a property shared among H-NS-like proteins. *Journal of Bacteriology* 187, 1845–1848. doi:10.1128/JB.187.5.1845-1848.2005
- Dame, R.T., Noom, M.C., Wuite, G.J.L., 2006. Bacterial chromatin organization by H-NS protein unravelled using dual DNA manipulation. *Nature* 444, 387–390. doi:10.1038/nature05283
- Dame, R.T., Wyman, C., Goosen, N., 2001. Structural basis for preferential binding of H-NS to curved DNA. *Biochimie* 83, 231–234.
- Dame, R.T., Wyman, C., Goosen, N., 2000. H-NS mediated compaction of DNA visualised by atomic force microscopy. *Nucleic Acids Research* 28, 3504–3510.
- Dame, R.T., Wyman, C., Wurm, R., Wagner, R., Goosen, N., 2002. Structural basis for H-NS-mediated trapping of RNA polymerase in the open initiation complex at the *rrnB* P1. *J. Biol. Chem.* 277, 2146–2150. doi:10.1074/jbc.C100603200
- Danilova, O., Reyes-Lamothe, R., Pinskaya, M., Sherratt, D., Possoz, C., 2007. MukB colocalizes with the *oriC* region and is required for organization of the two *Escherichia coli* chromosome arms into separate cell halves. *Mol Microbiol* 65, 1485–1492. doi:10.1111/j.1365-2958.2007.05881.x
- de Boer, P.A., Crossley, R.E., Rothfield, L.I., 1988. Isolation and properties of *minB*, a complex genetic locus involved in correct placement of the division site in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* 170, 2106–2112.
- de Jonge, B.L., Wientjes, F.B., Jurida, I., Driehuis, F., Wouters, J.T., Nanninga, N., 1989. Peptidoglycan synthesis during the cell cycle of *Escherichia coli*: composition and mode

- of insertion. *Journal of Bacteriology* 171, 5783–5794.
- Deghorain, M., Pagès, C., Meile, J.-C., Stouf, M., Capioux, H., Mercier, R., Lesterlin, C., Hallet, B., Cornet, F., 2011. A defined terminal region of the *E. coli* chromosome shows late segregation and high FtsK activity. *PLoS ONE* 6, e22164. doi:10.1371/journal.pone.0022164
- Diagne, C.T., Salhi, M., Crozat, E., Salomé, L., Cornet, F., Rousseau, P., Tardin, C., 2014. TPM analyses reveal that FtsK contributes both to the assembly and the activation of the XerCD-dif recombination synapse. *Nucleic Acids Research* 42, 1721–1732. doi:10.1093/nar/gkt1024
- DiGate, R.J., Marians, K.J., 1988. Identification of a potent decatenating enzyme from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 263, 13366–13373.
- DiNardo, S., Voelkel, K.A., Sternglanz, R., Reynolds, A.E., Wright, A., 1982. *Escherichia coli* DNA topoisomerase I mutants have compensatory mutations in DNA gyrase genes. *Cell* 31, 43–51.
- Ditto, M.D., Roberts, D., Weisberg, R.A., 1994. Growth phase variation of integration host factor level in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* 176, 3738–3748.
- Draper, G.C., McLennan, N., Begg, K., Masters, M., Donachie, W.D., 1998. Only the N-terminal domain of FtsK functions in cell division. *Journal of Bacteriology* 180, 4621–4627.
- Drolet, M., Broccoli, S., Rallu, F., Hraiky, C., Fortin, C., Massé, E., Baaklini, I., 2003. The problem of hypernegative supercoiling and R-loop formation in transcription. *Front. Biosci.* 8, d210–21.
- Drolet, M., Phoenix, P., Menzel, R., Massé, E., Liu, L.F., Crouch, R.J., 1995. Overexpression of RNase H partially complements the growth defect of an *Escherichia coli* delta topA mutant: R-loop formation is a major problem in the absence of DNA topoisomerase I. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92, 3526–3530.
- Du, S., Lutkenhaus, J., 2014. SImA antagonism of FtsZ assembly employs a two-pronged mechanism like MinCD. *PLoS Genet* 10, e1004460. doi:10.1371/journal.pgen.1004460
- Duggin, I.G., Bell, S.D., 2009. Termination structures in the *Escherichia coli* chromosome replication fork trap. *Journal of Molecular Biology* 387, 532–539. doi:10.1016/j.jmb.2009.02.027
- Dupaigne, P., Tonthat, N.K., Espéli, O., Whitfill, T., Boccard, F., Schumacher, M.A., 2012. Molecular basis for a protein-mediated DNA-bridging mechanism that functions in condensation of the *E. coli* chromosome. *Molecular Cell* 48, 560–571. doi:10.1016/j.molcel.2012.09.009
- Durand-Heredia, J., Rivkin, E., Fan, G., Morales, J., Janakiraman, A., 2012. Identification of ZapD as a cell division factor that promotes the assembly of FtsZ in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* 194, 3189–3198. doi:10.1128/JB.00176-12
- Ebersbach, G., Galli, E., Møller-Jensen, J., Löwe, J., Gerdes, K., 2008. Novel coiled-coil cell division factor ZapB stimulates Z ring assembly and cell division. *Mol Microbiol* 68, 720–735. doi:10.1111/j.1365-2958.2008.06190.x
- Endo, T., Sasaki, N., Tanaka, I., Nakata, M., 2002. Compact form of DNA induced by DNA-binding protein HU. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 290, 546–551. doi:10.1006/bbrc.2001.6222
- Espéli, O., Boccard, F., 1997. In vivo cleavage of *Escherichia coli* BIME-2 repeats by DNA gyrase: genetic characterization of the target and identification of the cut site. *Mol Microbiol* 26, 767–777.

- 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*. *The EMBO Journal* 31, 3198–3211. doi:10.1038/emboj.2012.128
- Espéli, O., Lee, C., Marians, K.J., 2003a. A physical and functional interaction between *Escherichia coli* FtsK and topoisomerase IV. *J. Biol. Chem.* 278, 44639–44644. doi:10.1074/jbc.M308926200
- Espéli, O., Levine, C., Hassing, H., Marians, K.J., 2003b. Temporal regulation of topoisomerase IV activity in *E. coli*. *Molecular Cell* 11, 189–201.
- Espéli, O., Mercier, R., Boccard, F., 2008. DNA dynamics vary according to macrodomain topography in the *E. coli* chromosome. *Mol Microbiol* 68, 1418–1427. doi:10.1111/j.1365-2958.2008.06239.x
- Espéli, O., Moulin, L., Boccard, F., 2001. Transcription attenuation associated with bacterial repetitive extragenic BIME elements. *Journal of Molecular Biology* 314, 375–386. doi:10.1006/jmbi.2001.5150
- Fekete, R.A., Chattoraj, D.K., 2005. A cis-acting sequence involved in chromosome segregation in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 55, 175–183. doi:10.1111/j.1365-2958.2004.04392.x
- Ferdows, M.S., Barbour, A.G., 1989. Megabase-sized linear DNA in the bacterium *Borrelia burgdorferi*, the Lyme disease agent. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86, 5969–5973.
- Freiesleben, von, U., Rasmussen, K.V., Schaechter, M., 1994. SeqA limits DnaA activity in replication from *oriC* in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 14, 763–772.
- Fujimitsu, K., Senriuchi, T., Katayama, T., 2009. Specific genomic sequences of *E. coli* promote replicational initiation by directly reactivating ADP-DnaA. *Genes & Development* 23, 1221–1233. doi:10.1101/gad.1775809
- Fujita, J., Maeda, Y., Nagao, C., Tsuchiya, Y., Miyazaki, Y., Hirose, M., Mizohata, E., Matsumoto, Y., Inoue, T., Mizuguchi, K., Matsumura, H., 2014. Crystal structure of FtsA from *Staphylococcus aureus*. *FEBS Lett.* 588, 1879–1885. doi:10.1016/j.febslet.2014.04.008
- Gajiwala, K.S., Burley, S.K., 2000. Winged helix proteins. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 10, 110–116.
- Galli, E., Gerdes, K., 2012. FtsZ-ZapA-ZapB interactome of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* 194, 292–302. doi:10.1128/JB.05821-11
- Geissler, B., Margolin, W., 2005. Evidence for functional overlap among multiple bacterial cell division proteins: compensating for the loss of FtsK. *Mol Microbiol* 58, 596–612. doi:10.1111/j.1365-2958.2005.04858.x
- Gellert, M., Mizuuchi, K., O'Dea, M.H., Nash, H.A., 1976. DNA gyrase: an enzyme that introduces superhelical turns into DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 73, 3872–3876.
- Glas, M., van den Berg van Saparoea, H.B., McLaughlin, S.H., Roseboom, W., Liu, F., Koningstein, G.M., Fish, A., Blaauwen, den, T., Heck, A.J.R., de Jong, L., Bitter, W., de Esch, I.J.P., Luirink, J., 2015. The Soluble Periplasmic Domains of *Escherichia coli* Cell Division Proteins FtsQ/FtsB/FtsL Form a Trimeric Complex with Submicromolar Affinity. *Journal of Biological Chemistry* 290, 21498–21509. doi:10.1074/jbc.M115.654756
- Goehring, N.W., Gonzalez, M.D., Beckwith, J., 2006. Premature targeting of cell division proteins to midcell reveals hierarchies of protein interactions involved in divisome assembly. *Mol Microbiol* 61, 33–45. doi:10.1111/j.1365-2958.2006.05206.x
- Goehring, N.W., Robichon, C., Beckwith, J., 2007. Role for the nonessential N terminus of FtsN in divisome assembly. *Journal of Bacteriology* 189, 646–649. doi:10.1128/JB.00992-06

- Gonzalez, M.D., Akbay, E.A., Boyd, D., Beckwith, J., 2010. Multiple interaction domains in FtsL, a protein component of the widely conserved bacterial FtsLBQ cell division complex. *Journal of Bacteriology* 192, 2757–2768. doi:10.1128/JB.01609-09
- Gonzalez, M.D., Beckwith, J., 2009. Divisome under construction: distinct domains of the small membrane protein FtsB are necessary for interaction with multiple cell division proteins. *Journal of Bacteriology* 191, 2815–2825. doi:10.1128/JB.01597-08
- Goodrich, J.A., Schwartz, M.L., McClure, W.R., 1990. Searching for and predicting the activity of sites for DNA binding proteins: compilation and analysis of the binding sites for *Escherichia coli* integration host factor (IHF). *Nucleic Acids Research* 18, 4993–5000.
- Gómez-Eichelmann, M.C., Camacho-Carranza, R., 1995. [DNA supercoiling and topoisomerases in *Escherichia coli*]. *Rev. Latinoam. Microbiol.* 37, 291–304.
- Graham, J.E., Sherratt, D.J., Szczelkun, M.D., 2010. Sequence-specific assembly of FtsK hexamers establishes directional translocation on DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107, 20263–20268. doi:10.1073/pnas.1007518107
- Grainge, I., Bregu, M., Vazquez, M., Sivanathan, V., Ip, S.C.Y., Sherratt, D.J., 2007. Unlinking chromosome catenanes in vivo by site-specific recombination. *The EMBO Journal* 26, 4228–4238. doi:10.1038/sj.emboj.7601849
- Grainger, D.C., Goldberg, M.D., Lee, D.J., Busby, S.J.W., 2008. Selective repression by Fis and H-NS at the *Escherichia coli* dps promoter. *Mol Microbiol* 68, 1366–1377. doi:10.1111/j.1365-2958.2008.06253.x
- Graumann, P.L., 2001. SMC proteins in bacteria: condensation motors for chromosome segregation? *Biochimie* 83, 53–59.
- Grimwade, J.E., Ryan, V.T., Leonard, A.C., 2000. IHF redistributes bound initiator protein, DnaA, on supercoiled oriC of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 35, 835–844.
- Haffter, P., Bickle, T.A., 1987. Purification and DNA-binding properties of FIS and Cin, two proteins required for the bacteriophage P1 site-specific recombination system, cin. *Journal of Molecular Biology* 198, 579–587.
- Hale, C.A., Shiomi, D., Liu, B., Bernhardt, T.G., Margolin, W., Niki, H., de Boer, P.A.J., 2011. Identification of *Escherichia coli* ZapC (YcbW) as a component of the division apparatus that binds and bundles FtsZ polymers. *Journal of Bacteriology* 193, 1393–1404. doi:10.1128/JB.01245-10
- Hansen, F.G., Christensen, B.B., Atlung, T., 2007. Sequence characteristics required for cooperative binding and efficient in vivo titration of the replication initiator protein DnaA in *E. coli*. *Journal of Molecular Biology* 367, 942–952. doi:10.1016/j.jmb.2007.01.056
- Hayama, R., Bahng, S., Karasu, M.E., Mariani, K.J., 2013. The MukB-ParC interaction affects the intramolecular, not intermolecular, activities of topoisomerase IV. *Journal of Biological Chemistry* 288, 7653–7661. doi:10.1074/jbc.M112.418087
- Hayama, R., Mariani, K.J., 2010. Physical and functional interaction between the condensin MukB and the decatenase topoisomerase IV in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107, 18826–18831. doi:10.1073/pnas.1008140107
- Helgesen, E., Fossum-Raunehaug, S., Skarstad, K., 2016. Lack of the H-NS protein results in extended and aberrantly positioned DNA during chromosome replication and segregation in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* JB.00919–15. doi:10.1128/JB.00919-15
- Helgesen, E., Fossum-Raunehaug, S., Sætre, F., Schink, K.O., Skarstad, K., 2015. Dynamic *Escherichia coli* SeqA complexes organize the newly replicated DNA at a considerable

- distance from the replisome. *Nucleic Acids Research* 43, 2730–2743.
doi:10.1093/nar/gkv146
- Hendrickson, H., Lawrence, J.G., 2007. Mutational bias suggests that replication termination occurs near the dif site, not at Ter sites. *Mol Microbiol* 64, 42–56. doi:10.1111/j.1365-2958.2007.05596.x
- Hengen, P.N., Bartram, S.L., Stewart, L.E., Schneider, T.D., 1997. Information analysis of Fis binding sites. *Nucleic Acids Research* 25, 4994–5002.
- Hiasa, H., DiGate, R.J., Marians, K.J., 1994. Decatenating activity of Escherichia coli DNA gyrase and topoisomerases I and III during oriC and pBR322 DNA replication in vitro. *J. Biol. Chem.* 269, 2093–2099.
- Hiasa, H., Marians, K.J., 1994. Topoisomerase III, but not topoisomerase I, can support nascent chain elongation during theta-type DNA replication. *J. Biol. Chem.* 269, 32655–32659.
- Higgins, Yang, X., Fu, Q., Roth, J.R., 1996. Surveying a supercoil domain by using the gamma delta resolution system in Salmonella typhimurium. *Journal of Bacteriology* 178, 2825–2835.
- Hiraga, S., Niki, H., Ogura, T., Ichinose, C., Mori, H., Ezaki, B., Jaffé, A., 1989. Chromosome partitioning in Escherichia coli: novel mutants producing anucleate cells. *Journal of Bacteriology* 171, 1496–1505.
- Hirano, T., 2002. The ABCs of SMC proteins: two-armed ATPases for chromosome condensation, cohesion, and repair. *Genes & Development* 16, 399–414.
doi:10.1101/gad.955102
- Hojgaard, A., Szerlong, H., Tabor, C., Kuempel, P., 1999. Norfloxacin-induced DNA cleavage occurs at the dif resolvase locus in Escherichia coli and is the result of interaction with topoisomerase IV. *Mol Microbiol* 33, 1027–1036.
- Holden, M.T.G., Seth-Smith, H.M.B., Crossman, L.C., Sebahia, M., Bentley, S.D., Cerdeño-Tárraga, A.M., Thomson, N.R., Bason, N., Quail, M.A., Sharp, S., Cherevach, I., Churcher, C., Goodhead, I., Hauser, H., Holroyd, N., Mungall, K., Scott, P., Walker, D., White, B., Rose, H., Iversen, P., Mil-Homens, D., Rocha, E.P.C., Fialho, A.M., Baldwin, A., Dowson, C., Barrell, B.G., Govan, J.R., Vandamme, P., Hart, C.A., Mahenthiralingam, E., Parkhill, J., 2009. The genome of Burkholderia cenocepacia J2315, an epidemic pathogen of cystic fibrosis patients. *Journal of Bacteriology* 191, 261–277. doi:10.1128/JB.01230-08
- Hommais, F., Krin, E., Laurent-Winter, C., Soutourina, O., Malpertuy, A., Le Caer, J.P., Danchin, A., Bertin, P., 2001. Large-scale monitoring of pleiotropic regulation of gene expression by the prokaryotic nucleoid-associated protein, H-NS. *Mol Microbiol* 40, 20–36.
- Hsieh, C.-W., Lin, T.-Y., Lai, H.-M., Lin, C.-C., Hsieh, T.-S., Shih, Y.-L., 2010. Direct MinE-membrane interaction contributes to the proper localization of MinDE in E. coli. *Mol Microbiol* 75, 499–512. doi:10.1111/j.1365-2958.2009.07006.x
- Hu, Z., Lutkenhaus, J., 2000. Analysis of MinC reveals two independent domains involved in interaction with MinD and FtsZ. *Journal of Bacteriology* 182, 3965–3971.
- Hu, Z., Saez, C., Lutkenhaus, J., 2003. Recruitment of MinC, an inhibitor of Z-ring formation, to the membrane in Escherichia coli: role of MinD and MinE. *Journal of Bacteriology* 185, 196–203. doi:10.1128/JB.185.1.196-203.2003
- Ikeda, M., Sato, T., Wachi, M., Jung, H.K., Ishino, F., Kobayashi, Y., Matsushashi, M., 1989. Structural similarity among Escherichia coli FtsW and RodA proteins and Bacillus subtilis SpoVE protein, which function in cell division, cell elongation, and spore formation,

- respectively. *Journal of Bacteriology* 171, 6375–6378.
- Ishino, F., Park, W., Tomioka, S., Tamaki, S., Takase, I., Kunugita, K., Matsuzawa, H., Asoh, S., Ohta, T., Spratt, B.G., 1986. Peptidoglycan synthetic activities in membranes of *Escherichia coli* caused by overproduction of penicillin-binding protein 2 and rodA protein. *J. Biol. Chem.* 261, 7024–7031.
- Jacob, F., Perrin, D., Sánchez, C., Monod, J., Edelman, S., 2005. [The operon: a group of genes with expression coordinated by an operator. *C.R.Acad. Sci. Paris* 250 (1960) 1727–1729]., *Comptes rendus biologiques*.
- Jacquet, M., Cukier-Kahn, R., Pla, J., Gros, F., 1971. A thermostable protein factor acting on in vitro DNA transcription. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 45, 1597–1607.
- Johnson, J.E., Lackner, L.L., de Boer, P.A.J., 2002. Targeting of (D)MinC/MinD and (D)MinC/DicB complexes to septal rings in *Escherichia coli* suggests a multistep mechanism for MinC-mediated destruction of nascent FtsZ rings. *Journal of Bacteriology* 184, 2951–2962. doi:10.1128/JB.184.11.2951-2962.2002
- Johnson, Simon, 1985. Hin-mediated site-specific recombination requires two 26 bp recombination sites and a 60 bp recombinational enhancer. *Cell* 41, 781–791.
- Joshi, M.C., Bourniquel, A., Fisher, J., Ho, B.T., Magnan, D., Kleckner, N., Bates, D., 2011. *Escherichia coli* sister chromosome separation includes an abrupt global transition with concomitant release of late-splitting intersister snaps. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108, 2765–2770. doi:10.1073/pnas.1019593108
- Joshi, M.C., Magnan, D., Montminy, T.P., Lies, M., Stepankiw, N., Bates, D., 2013. Regulation of sister chromosome cohesion by the replication fork tracking protein SeqA. *PLoS Genet* 9, e1003673. doi:10.1371/journal.pgen.1003673
- Kahmann, R., Rudt, F., Koch, C., Mertens, G., 1985. G inversion in bacteriophage Mu DNA is stimulated by a site within the invertase gene and a host factor. *Cell* 41, 771–780.
- Kang, S., Han, J.S., Park, J.H., Skarstad, K., Hwang, D.S., 2003. SeqA protein stimulates the relaxing and decatenating activities of topoisomerase IV. *J. Biol. Chem.* 278, 48779–48785. doi:10.1074/jbc.M308843200
- Kato, J., Nishimura, Y., Imamura, R., Niki, H., Hiraga, S., Suzuki, H., 1990. New topoisomerase essential for chromosome segregation in *E. coli*. *Cell* 63, 393–404.
- Kavenoff, R., Bowen, B.C., 1976. Electron microscopy of membrane-free folded chromosomes from *Escherichia coli*. *Chromosoma* 59, 89–101.
- Khodursky, A.B., Peter, B.J., Schmid, M.B., DeRisi, J., Botstein, D., Brown, P.O., Cozzarelli, N.R., 2000. Analysis of topoisomerase function in bacterial replication fork movement: use of DNA microarrays. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97, 9419–9424.
- Kreuzer, K.N., Cozzarelli, N.R., 1979. *Escherichia coli* mutants thermosensitive for deoxyribonucleic acid gyrase subunit A: effects on deoxyribonucleic acid replication, transcription, and bacteriophage growth. *Journal of Bacteriology* 140, 424–435.
- Lackner, L.L., Raskin, D.M., de Boer, P.A.J., 2003. ATP-dependent interactions between *Escherichia coli* Min proteins and the phospholipid membrane in vitro. *Journal of Bacteriology* 185, 735–749. doi:10.1128/JB.185.3.735-749.2003
- Lesterlin, C., Gigant, E., Boccard, F., Espéli, O., 2012. Sister chromatid interactions in bacteria revealed by a site-specific recombination assay. *The EMBO Journal* 31, 3468–3479. doi:10.1038/emboj.2012.194
- Lesterlin, C., Pagès, C., Dubarry, N., Dasgupta, S., Cornet, F., 2008. Asymmetry of chromosome Replichores renders the DNA translocase activity of FtsK essential for cell

- division and cell shape maintenance in *Escherichia coli*. *PLoS Genet* 4, e1000288.
doi:10.1371/journal.pgen.1000288
- Levy, O., Ptacin, J.L., Pease, P.J., Gore, J., Eisen, M.B., Bustamante, C., Cozzarelli, N.R., 2005. Identification of oligonucleotide sequences that direct the movement of the *Escherichia coli* FtsK translocase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102, 17618–17623.
doi:10.1073/pnas.0508932102
- Li, Y., Stewart, N.K., Berger, A.J., Vos, S., Schoeffler, A.J., Berger, J.M., Chait, B.T., Oakley, M.G., 2010. *Escherichia coli* condensin MukB stimulates topoisomerase IV activity by a direct physical interaction. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107, 18832–18837. doi:10.1073/pnas.1008678107
- Lin, Y.S., Kieser, H.M., Hopwood, D.A., Chen, C.W., 1993. The chromosomal DNA of *Streptomyces lividans* 66 is linear. *Mol Microbiol* 10, 923–933.
- Liu, L.F., Wang, 1987. Supercoiling of the DNA template during transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 84, 7024–7027.
- Lobry, J.R., 1996. Asymmetric substitution patterns in the two DNA strands of bacteria. *Mol. Biol. Evol.* 13, 660–665.
- Lobry, J.R., Louarn, J.-M., 2003. Polarisation of prokaryotic chromosomes. *Current Opinion in Microbiology* 6, 101–108.
- Loose, M., Mitchison, T.J., 2014. The bacterial cell division proteins FtsA and FtsZ self-organize into dynamic cytoskeletal patterns. *Nat. Cell Biol.* 16, 38–46.
doi:10.1038/ncb2885
- Losada, A., Hirano, T., 2005. Dynamic molecular linkers of the genome: the first decade of SMC proteins. *Genes & Development* 19, 1269–1287. doi:10.1101/gad.1320505
- Low, H.H., Moncrieffe, M.C., Löwe, J., 2004. The crystal structure of ZapA and its modulation of FtsZ polymerisation. *Journal of Molecular Biology* 341, 839–852.
doi:10.1016/j.jmb.2004.05.031
- Löwe, J., Amos, L.A., 1998. Crystal structure of the bacterial cell-division protein FtsZ. *Nature* 391, 203–206. doi:10.1038/34472
- Löwe, J., Ellonen, A., Allen, M.D., Atkinson, C., Sherratt, D.J., Grainge, I., 2008. Molecular mechanism of sequence-directed DNA loading and translocation by FtsK. *Molecular Cell* 31, 498–509. doi:10.1016/j.molcel.2008.05.027
- Lu, C., Reedy, M., Erickson, H.P., 2000. Straight and curved conformations of FtsZ are regulated by GTP hydrolysis. *Journal of Bacteriology* 182, 164–170.
- Lu, M., Campbell, J.L., Boye, E., Kleckner, N., 1994. SeqA: a negative modulator of replication initiation in *E. coli*. *Cell* 77, 413–426.
- Lutsenko, E., Bhagwat, A.S., 1999. Principal causes of hot spots for cytosine to thymine mutations at sites of cytosine methylation in growing cells. A model, its experimental support and implications. *Mutat. Res.* 437, 11–20.
- Massey, T.H., Aussel, L., Barre, F.-X., Sherratt, D.J., 2004. Asymmetric activation of Xer site-specific recombination by FtsK. *EMBO Rep.* 5, 399–404. doi:10.1038/sj.embor.7400116
- Massey, T.H., Mercogliano, C.P., Yates, J., Sherratt, D.J., Löwe, J., 2006. Double-stranded DNA translocation: structure and mechanism of hexameric FtsK. *Molecular Cell* 23, 457–469. doi:10.1016/j.molcel.2006.06.019
- Massé, E., Drolet, M., 1999a. R-loop-dependent hypernegative supercoiling in *Escherichia coli* topA mutants preferentially occurs at low temperatures and correlates with growth inhibition. *Journal of Molecular Biology* 294, 321–332. doi:10.1006/jmbi.1999.3264
- Massé, E., Drolet, M., 1999b. Relaxation of transcription-induced negative supercoiling is an

- essential function of Escherichia coli DNA topoisomerase I. *J. Biol. Chem.* 274, 16654–16658.
- Matoba, K., Yamazoe, M., Mayanagi, K., Morikawa, K., Hiraga, S., 2005. Comparison of MukB homodimer versus MukBEF complex molecular architectures by electron microscopy reveals a higher-order multimerization. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 333, 694–702. doi:10.1016/j.bbrc.2005.05.163
- Matsui, M., Oka, A., Takanami, M., Yasuda, S., Hirota, Y., 1985. Sites of dnaA protein-binding in the replication origin of the Escherichia coli K-12 chromosome. *Journal of Molecular Biology* 184, 529–533.
- Männik, J., Bailey, M.W., 2015. Spatial coordination between chromosomes and cell division proteins in Escherichia coli. *Front Microbiol* 6, 306. doi:10.3389/fmicb.2015.00306
- Männik, J., Wu, F., Hol, F.J.H., Bisicchia, P., Sherratt, D.J., Keymer, J.E., Dekker, C., 2012. Robustness and accuracy of cell division in Escherichia coli in diverse cell shapes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109, 6957–6962. doi:10.1073/pnas.1120854109
- McEachern, F., Fisher, L.M., 1989. Regulation of DNA supercoiling in Escherichia coli: genetic basis of a compensatory mutation in DNA gyrase. *FEBS Lett.* 253, 67–70.
- Melby, T.E., Ciampaglio, C.N., Briscoe, G., Erickson, H.P., 1998. The symmetrical structure of structural maintenance of chromosomes (SMC) and MukB proteins: long, antiparallel coiled coils, folded at a flexible hinge. *J. Cell Biol.* 142, 1595–1604.
- Mendieta, J., Rico, A.I., López-Viñas, E., Vicente, M., Mingorance, J., Gómez-Puertas, P., 2009. Structural and functional model for ionic (K⁺)/Na⁺) and pH dependence of GTPase activity and polymerization of FtsZ, the prokaryotic ortholog of tubulin. *Journal of Molecular Biology* 390, 17–25. doi:10.1016/j.jmb.2009.05.018
- Mercer, K.L.N., Weiss, D.S., 2002. The Escherichia coli cell division protein FtsW is required to recruit its cognate transpeptidase, FtsI (PBP3), to the division site. *Journal of Bacteriology* 184, 904–912. doi:10.1128/jb.184.4.904-912.2002
- Mercier, R., Petit, M.-A., Schbath, S., Robin, S., Karoui, El, M., Bocard, F., Espéli, O., 2008. The MatP/matS site-specific system organizes the terminus region of the E. coli chromosome into a macrodomain. *Cell* 135, 475–485. doi:10.1016/j.cell.2008.08.031
- Messer, W., 2002. The bacterial replication initiator DnaA. DnaA and oriC, the bacterial mode to initiate DNA replication. *FEMS Microbiol. Rev.* 26, 355–374.
- Messer, W., Weigel, C., 1997. DnaA initiator--also a transcription factor. *Mol Microbiol* 24, 1–6.
- Michel, B., Recchia, G.D., Penel-Colin, M., Ehrlich, S.D., Sherratt, D.J., 2000. Resolution of holliday junctions by RuvABC prevents dimer formation in rep mutants and UV-irradiated cells. *Mol Microbiol* 37, 180–191.
- Mirkin, E.V., Mirkin, S.M., 2007. Replication fork stalling at natural impediments. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 71, 13–35. doi:10.1128/MMBR.00030-06
- Montero Llopis, P., Jackson, A.F., Sliusarenko, O., Surovtsev, I., Heinritz, J., Emonet, T., Jacobs-Wagner, C., 2010. Spatial organization of the flow of genetic information in bacteria. *Nature* 466, 77–81. doi:10.1038/nature09152
- Morgenstein, R.M., Bratton, B.P., Nguyen, J.P., Ouzounov, N., Shaevitz, J.W., Gitai, Z., 2015. RodZ links MreB to cell wall synthesis to mediate MreB rotation and robust morphogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 112, 12510–12515. doi:10.1073/pnas.1509610112
- Mosyak, L., Zhang, Y., Glasfeld, E., Haney, S., Stahl, M., Seehra, J., Somers, W.S., 2000. The

- bacterial cell-division protein ZipA and its interaction with an FtsZ fragment revealed by X-ray crystallography. *The EMBO Journal* 19, 3179–3191. doi:10.1093/emboj/19.13.3179
- Moulin, L., Rahmouni, A.R., Boccard, F., 2005. Topological insulators inhibit diffusion of transcription-induced positive supercoils in the chromosome of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 55, 601–610. doi:10.1111/j.1365-2958.2004.04411.x
- Mulcair, M.D., Schaeffer, P.M., Oakley, A.J., Cross, H.F., Neylon, C., Hill, T.M., Dixon, N.E., 2006. A molecular mousetrap determines polarity of termination of DNA replication in *E. coli*. *Cell* 125, 1309–1319. doi:10.1016/j.cell.2006.04.040
- Murtin, C., Engelhorn, M., Geiselman, J., Boccard, F., 1998. A quantitative UV laser footprinting analysis of the interaction of IHF with specific binding sites: re-evaluation of the effective concentration of IHF in the cell. *Journal of Molecular Biology* 284, 949–961. doi:10.1006/jmbi.1998.2256
- Nakata, A., Amemura, M., Makino, K., 1989. Unusual nucleotide arrangement with repeated sequences in the *Escherichia coli* K-12 chromosome. *Journal of Bacteriology* 171, 3553–3556.
- Nash, H.A., Robertson, C.A., 1981. Purification and properties of the *Escherichia coli* protein factor required for lambda integrative recombination. *J. Biol. Chem.* 256, 9246–9253.
- Neylon, C., Brown, S.E., Kralicek, A.V., Miles, C.S., Love, C.A., Dixon, N.E., 2000. Interaction of the *Escherichia coli* replication terminator protein (Tus) with DNA: a model derived from DNA-binding studies of mutant proteins by surface plasmon resonance. *Biochemistry* 39, 11989–11999.
- Nichols, M.D., DeAngelis, K., Keck, J.L., Berger, J.M., 1999. Structure and function of an archaeal topoisomerase VI subunit with homology to the meiotic recombination factor Spo11. *The EMBO Journal* 18, 6177–6188. doi:10.1093/emboj/18.21.6177
- Nicolas, E., Upton, A.L., Uphoff, S., Henry, O., Badrinarayanan, A., Sherratt, D., 2014. The SMC complex MukBEF recruits topoisomerase IV to the origin of replication region in live *Escherichia coli*. *mBio* 5, e01001–13. doi:10.1128/mBio.01001-13
- Nielsen, H.J., Li, Y., Youngren, B., Hansen, F.G., Austin, S., 2006. Progressive segregation of the *Escherichia coli* chromosome. *Mol Microbiol* 61, 383–393. doi:10.1111/j.1365-2958.2006.05245.x
- Nievera, C., Torgue, J.J.-C., Grimwade, J.E., Leonard, A.C., 2006. SeqA blocking of DnaA-oriC interactions ensures staged assembly of the *E. coli* pre-RC. *Molecular Cell* 24, 581–592. doi:10.1016/j.molcel.2006.09.016
- Niki, H., Imamura, R., Kitaoka, M., Yamanaka, K., Ogura, T., Hiraga, S., 1992. *E. coli* MukB protein involved in chromosome partition forms a homodimer with a rod-and-hinge structure having DNA binding and ATP/GTP binding activities. *The EMBO Journal* 11, 5101–5109.
- Niki, H., Jaffé, A., Imamura, R., Ogura, T., Hiraga, S., 1991. The new gene mukB codes for a 177 kd protein with coiled-coil domains involved in chromosome partitioning of *E. coli*. *The EMBO Journal* 10, 183–193.
- Niki, H., Yamaichi, Y., Hiraga, S., 2000. Dynamic organization of chromosomal DNA in *Escherichia coli*. *Genes & Development* 14, 212–223.
- Nolivos, S., Sherratt, D., 2014. The bacterial chromosome: architecture and action of bacterial SMC and SMC-like complexes. *FEMS Microbiol. Rev.* 38, 380–392. doi:10.1111/1574-6976.12045
- Nolivos, S., Upton, A.L., Badrinarayanan, A., Müller, J., Zawadzka, K., Wiktor, J., Gill, A., Arciszewska, L., Nicolas, E., Sherratt, D., 2016. MatP regulates the coordinated action of

- topoisomerase IV and MukBEF in chromosome segregation. *Nat Commun* 7, 10466. doi:10.1038/ncomms10466
- Nurse, P., Levine, C., Hassing, H., Mariani, K.J., 2003. Topoisomerase III can serve as the cellular decatenase in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 278, 8653–8660. doi:10.1074/jbc.M211211200
- Oberto, J., Drlica, K., Rouvière-Yaniv, J., 1994. Histones, HMG, HU, IHF: Mème combat. *Biochimie* 76, 901–908.
- Oram, M., Fisher, L.M., 1992. An *Escherichia coli* DNA topoisomerase I mutant has a compensatory mutation that alters two residues between functional domains of the DNA gyrase A protein. *Journal of Bacteriology* 174, 4175–4178.
- Pan, C.Q., Finkel, S.E., Cramton, S.E., Feng, J.A., Sigman, D.S., Johnson, 1996. Variable structures of Fis-DNA complexes determined by flanking DNA-protein contacts. *Journal of Molecular Biology* 264, 675–695. doi:10.1006/jmbi.1996.0669
- Pandey, M., Elshenawy, M.M., Jergic, S., Takahashi, M., Dixon, N.E., Hamdan, S.M., Patel, S.S., 2015. Two mechanisms coordinate replication termination by the *Escherichia coli* Tus-Ter complex. *Nucleic Acids Research* 43, 5924–5935. doi:10.1093/nar/gkv527
- Pazos, M., Natale, P., Margolin, W., Vicente, M., 2013a. Interactions among the early *Escherichia coli* divisome proteins revealed by bimolecular fluorescence complementation. *Environ. Microbiol.* 15, 3282–3291. doi:10.1111/1462-2920.12225
- Pazos, M., Natale, P., Vicente, M., 2013b. A specific role for the ZipA protein in cell division: stabilization of the FtsZ protein. *Journal of Biological Chemistry* 288, 3219–3226. doi:10.1074/jbc.M112.434944
- Pease, P.J., Levy, O., Cost, G.J., Gore, J., Ptacin, J.L., Sherratt, D., Bustamante, C., Cozzarelli, N.R., 2005. Sequence-directed DNA translocation by purified FtsK. *Science* 307, 586–590. doi:10.1126/science.1104885
- Perez-Cheeks, B.A., Lee, C., Hayama, R., Mariani, K.J., 2012. A role for topoisomerase III in *Escherichia coli* chromosome segregation. *Mol Microbiol* 86, 1007–1022. doi:10.1111/mmi.12039
- Peter, B.J., Arsuaga, J., Breier, A.M., Khodursky, A.B., Brown, P.O., Cozzarelli, N.R., 2004. Genomic transcriptional response to loss of chromosomal supercoiling in *Escherichia coli*. *Genome Biol.* 5, R87. doi:10.1186/gb-2004-5-11-r87
- Petrushenko, Z.M., Cui, Y., She, W., Rybenkov, V.V., 2010. Mechanics of DNA bridging by bacterial condensin MukBEF in vitro and in singulo. *The EMBO Journal* 29, 1126–1135. doi:10.1038/emboj.2009.414
- Petrushenko, Z.M., Lai, C.-H., Rai, R., Rybenkov, V.V., 2006. DNA reshaping by MukB. Right-handed knotting, left-handed supercoiling. *J. Biol. Chem.* 281, 4606–4615. doi:10.1074/jbc.M504754200
- Petrushenko, Z.M., She, W., Rybenkov, V.V., 2011. A new family of bacterial condensins. *Mol Microbiol* 81, 881–896. doi:10.1111/j.1365-2958.2011.07763.x
- Pinson, V., Takahashi, M., Rouvière-Yaniv, J., 1999. Differential binding of the *Escherichia coli* HU, homodimeric forms and heterodimeric form to linear, gapped and cruciform DNA. *Journal of Molecular Biology* 287, 485–497. doi:10.1006/jmbi.1999.2631
- Pomerantz, R.T., O'Donnell, M., 2007. Replisome mechanics: insights into a twin DNA polymerase machine. *Trends Microbiol.* 15, 156–164. doi:10.1016/j.tim.2007.02.007
- Postow, L., Crisona, N.J., Peter, B.J., Hardy, C.D., Cozzarelli, N.R., 2001. Topological challenges to DNA replication: conformations at the fork. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98, 8219–8226. doi:10.1073/pnas.111006998

- Postow, L., Hardy, C.D., Arsuaga, J., Cozzarelli, N.R., 2004. Topological domain structure of the *Escherichia coli* chromosome. *Genes & Development* 18, 1766–1779. doi:10.1101/gad.1207504
- Price, M.N., Alm, E.J., Arkin, A.P., 2005. Interruptions in gene expression drive highly expressed operons to the leading strand of DNA replication. *Nucleic Acids Research* 33, 3224–3234. doi:10.1093/nar/gki638
- Prieto, A.I., Kahramanoglou, C., Ali, R.M., Fraser, G.M., Seshasayee, A.S.N., Luscombe, N.M., 2012. Genomic analysis of DNA binding and gene regulation by homologous nucleoid-associated proteins IHF and HU in *Escherichia coli* K12. *Nucleic Acids Research* 40, 3524–3537. doi:10.1093/nar/gkr1236
- Pruss, G.J., Manes, S.H., Drlica, K., 1982. *Escherichia coli* DNA topoisomerase I mutants: increased supercoiling is corrected by mutations near gyrase genes. *Cell* 31, 35–42.
- Radman, M., 1998. DNA replication: one strand may be more equal. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95, 9718–9719.
- Raskin, D.M., de Boer, P.A., 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, 4971–4976.
- Raskin, D.M., de Boer, P.A., 1997. The MinE ring: an FtsZ-independent cell structure required for selection of the correct division site in *E. coli*. *Cell* 91, 685–694.
- Reyes-Lamothe, R., Possoz, C., Danilova, O., Sherratt, D.J., 2008. Independent positioning and action of *Escherichia coli* replisomes in live cells. *Cell* 133, 90–102. doi:10.1016/j.cell.2008.01.044
- Reyes-Lamothe, R., Sherratt, D.J., Leake, M.C., 2010. Stoichiometry and architecture of active DNA replication machinery in *Escherichia coli*. *Science* 328, 498–501. doi:10.1126/science.1185757
- Riber, L., Løbner-Olesen, A., 2005. Coordinated replication and sequestration of *oriC* and *dnaA* are required for maintaining controlled once-per-cell-cycle initiation in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* 187, 5605–5613. doi:10.1128/JB.187.16.5605-5613.2005
- Rico, A.I., García-Ovalle, M., Mingorance, J., Vicente, M., 2004. Role of two essential domains of *Escherichia coli* FtsA in localization and progression of the division ring. *Mol Microbiol* 53, 1359–1371. doi:10.1111/j.1365-2958.2004.04245.x
- Rivas, G., López, A., Mingorance, J., Ferrándiz, M.J., Zorrilla, S., Minton, A.P., Vicente, M., Andreu, J.M., 2000. Magnesium-induced linear self-association of the FtsZ bacterial cell division protein monomer. The primary steps for FtsZ assembly. *J. Biol. Chem.* 275, 11740–11749.
- Rocha, E.P.C., Danchin, A., 2003. Gene essentiality determines chromosome organisation in bacteria. *Nucleic Acids Research* 31, 6570–6577. doi:10.1093/nar/gkg859
- Ryan, V.T., Grimwade, J.E., Camara, J.E., Croke, E., Leonard, A.C., 2004. *Escherichia coli* prereplication complex assembly is regulated by dynamic interplay among Fis, IHF and DnaA. *Mol Microbiol* 51, 1347–1359. doi:10.1046/j.1365-2958.2003.03906.x
- Saleh, O.A., Péral, C., Barre, F.-X., Allemand, J.-F., 2004. Fast, DNA-sequence independent translocation by FtsK in a single-molecule experiment. *The EMBO Journal* 23, 2430–2439. doi:10.1038/sj.emboj.7600242
- Samitt, C.E., Hansen, F.G., Miller, J.F., Schaechter, M., 1989. In vivo studies of DnaA binding to the origin of replication of *Escherichia coli*. *The EMBO Journal* 8, 989–993.
- Sato, Y.T., Watanabe, S., Kenmotsu, T., Ichikawa, M., Yoshikawa, Y., Teramoto, J., Imanaka, T., Ishihama, A., Yoshikawa, K., 2013. Structural change of DNA induced by nucleoid

- proteins: growth phase-specific Fis and stationary phase-specific Dps. *Biophys. J.* 105, 1037–1044. doi:10.1016/j.bpj.2013.07.025
- Sawitzke, J.A., Austin, S., 2000. Suppression of chromosome segregation defects of *Escherichia coli* muk mutants by mutations in topoisomerase I. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97, 1671–1676. doi:10.1073/pnas.030528397
- Scheffers, D.-J., de Wit, J.G., Blaauwen, den, T., Driessen, A.J.M., 2002. GTP hydrolysis of cell division protein FtsZ: evidence that the active site is formed by the association of monomers. *Biochemistry* 41, 521–529.
- Schneider, R., Lurz, R., Lüder, G., Tolksdorf, C., Travers, A., Muskhelishvili, G., 2001. An architectural role of the *Escherichia coli* chromatin protein FIS in organising DNA. *Nucleic Acids Research* 29, 5107–5114.
- Schneider, R., Travers, A., Kutateladze, T., Muskhelishvili, G., 1999. A DNA architectural protein couples cellular physiology and DNA topology in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 34, 953–964.
- Schneiker, S., Perlova, O., Kaiser, O., Gerth, K., Alici, A., Altmeyer, M.O., Bartels, D., Bekel, T., Beyer, S., Bode, E., Bode, H.B., Bolten, C.J., Choudhuri, J.V., Doss, S., Elnakady, Y.A., Frank, B., Gaigalat, L., Goesmann, A., Groeger, C., Gross, F., Jelsbak, L., Jelsbak, L., Kalinowski, J., Kegler, C., Knauber, T., Konietzny, S., Kopp, M., Krause, L., Krug, D., Linke, B., Mahmud, T., Martinez-Arias, R., McHardy, A.C., Merai, M., Meyer, F., Mormann, S., Muñoz-Dorado, J., Perez, J., Pradella, S., Rachid, S., Raddatz, G., Rosenau, F., Rückert, C., Sasse, F., Scharfe, M., Schuster, S.C., Suen, G., Treuner-Lange, A., Velicer, G.J., Vorhölter, F.-J., Weissman, K.J., Welch, R.D., Wenzel, S.C., Whitworth, D.E., Wilhelm, S., Wittmann, C., Blöcker, H., Pühler, A., Müller, R., 2007. Complete genome sequence of the myxobacterium *Sorangium cellulosum*. *Nat. Biotechnol.* 25, 1281–1289. doi:10.1038/nbt1354
- Seol, Y., Hardin, A.H., Strub, M.-P., Charvin, G., Neuman, K.C., 2013. Comparison of DNA decatenation by *Escherichia coli* topoisomerase IV and topoisomerase III: implications for non-equilibrium topology simplification. *Nucleic Acids Research* 41, 4640–4649. doi:10.1093/nar/gkt136
- Shen, B., Lutkenhaus, J., 2010. Examination of the interaction between FtsZ and MinCN in *E. coli* suggests how MinC disrupts Z rings. *Mol Microbiol* 75, 1285–1298. doi:10.1111/j.1365-2958.2010.07055.x
- Sherratt, D.J., 2003. Bacterial chromosome dynamics. *Science* 301, 780–785. doi:10.1126/science.1084780
- Shih, Y.-L., Huang, K.-F., Lai, H.-M., Liao, J.-H., Lee, C.-S., Chang, C.-M., Mak, H.-M., Hsieh, C.-W., Lin, C.-C., 2011. The N-terminal amphipathic helix of the topological specificity factor MinE is associated with shaping membrane curvature. *PLoS ONE* 6, e21425. doi:10.1371/journal.pone.0021425
- Shindo, H., Furubayashi, A., Shimizu, M., Miyake, M., Imamoto, F., 1992. Preferential binding of *E. coli* histone-like protein HU alpha to negatively supercoiled DNA. *Nucleic Acids Research* 20, 1553–1558.
- Shiomi, D., Sakai, M., Niki, H., 2008. Determination of bacterial rod shape by a novel cytoskeletal membrane protein. *The EMBO Journal* 27, 3081–3091. doi:10.1038/emboj.2008.234
- Sinden, R.R., Pettijohn, D.E., 1981. Chromosomes in living *Escherichia coli* cells are segregated into domains of supercoiling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 78, 224–228.
- Sivanathan, V., Allen, M.D., de Bekker, C., Baker, R., Arciszewska, L.K., Freund, S.M., Bycroft,

- M., Löwe, J., Sherratt, D.J., 2006. The FtsK gamma domain directs oriented DNA translocation by interacting with KOPS. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 13, 965–972. doi:10.1038/nsmb1158
- Sliusarenko, O., Heinritz, J., Emonet, T., Jacobs-Wagner, C., 2011. High-throughput, subpixel precision analysis of bacterial morphogenesis and intracellular spatio-temporal dynamics. *Mol Microbiol* 80, 612–627. doi:10.1111/j.1365-2958.2011.07579.x
- Small, E., Marrington, R., Rodger, A., Scott, D.J., Sloan, K., Roper, D., Dafforn, T.R., Addinall, S.G., 2007. FtsZ polymer-bundling by the *Escherichia coli* ZapA orthologue, YgfE, involves a conformational change in bound GTP. *Journal of Molecular Biology* 369, 210–221. doi:10.1016/j.jmb.2007.03.025
- Smith, G.R., 2001. Homologous recombination near and far from DNA breaks: alternative roles and contrasting views. *Annu. Rev. Genet.* 35, 243–274. doi:10.1146/annurev.genet.35.102401.090509
- Smith, G.R., Kunes, S.M., Schultz, D.W., Taylor, A., Triman, K.L., 1981. Structure of chi hotspots of generalized recombination. *Cell* 24, 429–436.
- Speck, C., Weigel, C., Messer, W., 1999. ATP- and ADP-dnaA protein, a molecular switch in gene regulation. *The EMBO Journal* 18, 6169–6176. doi:10.1093/emboj/18.21.6169
- Srivatsan, A., Tehranchi, A., MacAlpine, D.M., Wang, J.D., 2010. Co-orientation of replication and transcription preserves genome integrity. *PLoS Genet* 6, e1000810. doi:10.1371/journal.pgen.1000810
- Stonington, O.G., Pettijohn, D.E., 1971. The folded genome of *Escherichia coli* isolated in a protein-DNA-RNA complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 68, 6–9.
- Stouf, M., Meile, J.-C., Cornet, F., 2013. FtsK actively segregates sister chromosomes in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110, 11157–11162. doi:10.1073/pnas.1304080110
- Stricker, J., Maddox, P., Salmon, E.D., Erickson, H.P., 2002. Rapid assembly dynamics of the *Escherichia coli* FtsZ-ring demonstrated by fluorescence recovery after photobleaching. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99, 3171–3175. doi:10.1073/pnas.052595099
- Su'etsugu, M., Nakamura, K., Keyamura, K., Kudo, Y., Katayama, T., 2008. Hda monomerization by ADP binding promotes replicase clamp-mediated DnaA-ATP hydrolysis. *J. Biol. Chem.* 283, 36118–36131. doi:10.1074/jbc.M803158200
- Szwedziak, P., Wang, Q., Freund, S.M.V., Löwe, J., 2012. FtsA forms actin-like protofilaments. *The EMBO Journal* 31, 2249–2260. doi:10.1038/emboj.2012.76
- Talukder, A., Ishihama, A., 2015. Growth phase dependent changes in the structure and protein composition of nucleoid in *Escherichia coli*. *Sci China Life Sci* 58, 902–911. doi:10.1007/s11427-015-4898-0
- Talukder, Ishihama, A., 1999. Twelve species of the nucleoid-associated protein from *Escherichia coli*. Sequence recognition specificity and DNA binding affinity. *J. Biol. Chem.* 274, 33105–33113.
- Thiel, A., Valens, M., Vallet-Gely, I., Espéli, O., Boccard, F., 2012. Long-range chromosome organization in *E. coli*: a site-specific system isolates the Ter macrodomain. *PLoS Genet* 8, e1002672. doi:10.1371/journal.pgen.1002672
- Tillier, E.R., Collins, R.A., 2000. The contributions of replication orientation, gene direction, and signal sequences to base-composition asymmetries in bacterial genomes. *J. Mol. Evol.* 50, 249–257.
- Tonthat, N.K., Arold, S.T., Pickering, B.F., Van Dyke, M.W., Liang, S., Lu, Y., Beuria, T.K., Margolin, W., Schumacher, M.A., 2011. Molecular mechanism by which the nucleoid

- occlusion factor, SlmA, keeps cytokinesis in check. *The EMBO Journal* 30, 154–164. doi:10.1038/emboj.2010.288
- Tonthat, N.K., Milam, S.L., Chinnam, N., Whitfill, T., Margolin, W., Schumacher, M.A., 2013. SlmA forms a higher-order structure on DNA that inhibits cytokinetic Z-ring formation over the nucleoid. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110, 10586–10591. doi:10.1073/pnas.1221036110
- Touzain, F., Petit, M.-A., Schbath, S., Karoui, El, M., 2011. DNA motifs that sculpt the bacterial chromosome. *Nat. Rev. Microbiol.* 9, 15–26. doi:10.1038/nrmicro2477
- Uehara, T., Dinh, T., Bernhardt, T.G., 2009. LytM-domain factors are required for daughter cell separation and rapid ampicillin-induced lysis in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* 191, 5094–5107. doi:10.1128/JB.00505-09
- Uehara, T., Parzych, K.R., Dinh, T., Bernhardt, T.G., 2010. Daughter cell separation is controlled by cytokinetic ring-activated cell wall hydrolysis. *The EMBO Journal* 29, 1412–1422. doi:10.1038/emboj.2010.36
- Ussery, D., Larsen, T.S., Wilkes, K.T., Friis, C., Worning, P., Krogh, A., Brunak, S., 2001. Genome organisation and chromatin structure in *Escherichia coli*. *Biochimie* 83, 201–212.
- Valens, M., Penaud, S., Rossignol, M., Cornet, F., Boccard, F., 2004. Macrodome organization of the *Escherichia coli* chromosome. *The EMBO Journal* 23, 4330–4341. doi:10.1038/sj.emboj.7600434
- van den Ent, F., Johnson, C.M., Persons, L., de Boer, P., Löwe, J., 2010. Bacterial actin MreB assembles in complex with cell shape protein RodZ. *The EMBO Journal* 29, 1081–1090. doi:10.1038/emboj.2010.9
- van den Ent, F., Löwe, J., 2000. Crystal structure of the cell division protein FtsA from *Thermotoga maritima*. *The EMBO Journal* 19, 5300–5307. doi:10.1093/emboj/19.20.5300
- van Noort, J., Verbrugge, S., Goosen, N., Dekker, C., Dame, R.T., 2004. Dual architectural roles of HU: formation of flexible hinges and rigid filaments. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101, 6969–6974. doi:10.1073/pnas.0308230101
- Vora, T., Hottes, A.K., Tavazoie, S., 2009. Protein occupancy landscape of a bacterial genome. *Molecular Cell* 35, 247–253. doi:10.1016/j.molcel.2009.06.035
- Vos, S.M., Lee, I., Berger, J.M., 2013a. Distinct regions of the *Escherichia coli* ParC C-terminal domain are required for substrate discrimination by topoisomerase IV. *Journal of Molecular Biology* 425, 3029–3045. doi:10.1016/j.jmb.2013.04.033
- Vos, S.M., Stewart, N.K., Oakley, M.G., Berger, J.M., 2013b. Structural basis for the MukB-topoisomerase IV interaction and its functional implications in vivo. *The EMBO Journal* 32, 2950–2962. doi:10.1038/emboj.2013.218
- Walker, K.A., Atkins, C.L., Osuna, R., 1999. Functional determinants of the *Escherichia coli* fis promoter: roles of -35, -10, and transcription initiation regions in the response to stringent control and growth phase-dependent regulation. *Journal of Bacteriology* 181, 1269–1280.
- Walker, Saraste, M., Runswick, M.J., Gay, N.J., 1982. Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *The EMBO Journal* 1, 945–951.
- Wang, 1971. Interaction between DNA and an *Escherichia coli* protein omega. *Journal of Molecular Biology* 55, 523–533.
- Wang, J.C., 2002. Cellular roles of DNA topoisomerases: a molecular perspective. *Nat. Rev.*

- Mol. Cell Biol. 3, 430–440. doi:10.1038/nrm831
- Wang, L., Lutkenhaus, J., 1998. FtsK is an essential cell division protein that is localized to the septum and induced as part of the SOS response. *Mol Microbiol* 29, 731–740.
- Wang, Liu, X., Possoz, C., Sherratt, D.J., 2006. The two *Escherichia coli* chromosome arms locate to separate cell halves. *Genes & Development* 20, 1727–1731. doi:10.1101/gad.388406
- Wang, Reyes-Lamothe, R., Sherratt, D.J., 2008. Modulation of *Escherichia coli* sister chromosome cohesion by topoisomerase IV. *Genes & Development* 22, 2426–2433. doi:10.1101/gad.487508
- Weinstein-Fischer, D., Elgrably-Weiss, M., Altuvia, S., 2000. *Escherichia coli* response to hydrogen peroxide: a role for DNA supercoiling, topoisomerase I and Fis. *Mol Microbiol* 35, 1413–1420.
- Weitao, T., Nordström, K., Dasgupta, S., 2000. *Escherichia coli* cell cycle control genes affect chromosome superhelicity. *EMBO Rep.* 1, 494–499. doi:10.1093/embo-reports/kvd106
- Welch, R.A., Burland, V., Plunkett, G., Redford, P., Roesch, P., Rasko, D., Buckles, E.L., Liou, S.-R., Boutin, A., Hackett, J., Stroud, D., Mayhew, G.F., Rose, D.J., Zhou, S., Schwartz, D.C., Perna, N.T., Mobley, H.L.T., Donnenberg, M.S., Blattner, F.R., 2002. Extensive mosaic structure revealed by the complete genome sequence of uropathogenic *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99, 17020–17024. doi:10.1073/pnas.252529799
- Wissel, M.C., Weiss, D.S., 2004. Genetic analysis of the cell division protein FtsI (PBP3): amino acid substitutions that impair septal localization of FtsI and recruitment of FtsN. *Journal of Bacteriology* 186, 490–502. doi:10.1128/JB.186.2.490-502.2004
- Wolf, Frenkiel, D., Arad, T., Finkel, S.E., Kolter, R., Minsky, A., 1999. DNA protection by stress-induced biocrystallization. *Nature* 400, 83–85. doi:10.1038/21918
- Woo, J.-S., Lim, J.-H., Shin, H.-C., Suh, M.-K., Ku, B., Lee, K.-H., Joo, K., Robinson, H., Lee, J., Park, S.-Y., Ha, N.-C., Oh, B.-H., 2009. Structural studies of a bacterial condensin complex reveal ATP-dependent disruption of intersubunit interactions. *Cell* 136, 85–96. doi:10.1016/j.cell.2008.10.050
- Worcel, A., Burgi, E., 1972. On the structure of the folded chromosome of *Escherichia coli*. *Journal of Molecular Biology* 71, 127–147.
- Wu, L.J., Errington, J., 2004. Coordination of cell division and chromosome segregation by a nucleoid occlusion protein in *Bacillus subtilis*. *Cell* 117, 915–925. doi:10.1016/j.cell.2004.06.002
- Yamaichi, Y., Niki, H., 2004. migS, a cis-acting site that affects bipolar positioning of oriC on the *Escherichia coli* chromosome. *The EMBO Journal* 23, 221–233. doi:10.1038/sj.emboj.7600028
- Yamanaka, K., Ogura, T., Niki, H., Hiraga, S., 1996. Identification of two new genes, mukE and mukF, involved in chromosome partitioning in *Escherichia coli*. *Mol. Gen. Genet.* 250, 241–251.
- Yamanaka, K., Ogura, T., Niki, H., Hiraga, S., 1995. Characterization of the smtA gene encoding an S-adenosylmethionine-dependent methyltransferase of *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Lett.* 133, 59–63.
- Yang, D.C., Peters, N.T., Parzych, K.R., Uehara, T., Markovski, M., Bernhardt, T.G., 2011. An ATP-binding cassette transporter-like complex governs cell-wall hydrolysis at the bacterial cytokinetic ring. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108, E1052–60. doi:10.1073/pnas.1107780108

- Yang, S.W., Nash, H.A., 1995. Comparison of protein binding to DNA in vivo and in vitro: defining an effective intracellular target. *The EMBO Journal* 14, 6292–6300.
- Yu, X.C., Margolin, W., 1997. Ca²⁺-mediated GTP-dependent dynamic assembly of bacterial cell division protein FtsZ into asters and polymer networks in vitro. *The EMBO Journal* 16, 5455–5463. doi:10.1093/emboj/16.17.5455
- Zawadzki, P., Stracy, M., Ginda, K., Zawadzka, K., Lesterlin, C., Kapanidis, A.N., Sherratt, D.J., 2015. The Localization and Action of Topoisomerase IV in Escherichia coli Chromosome Segregation Is Coordinated by the SMC Complex, MukBEF. *Cell Rep* 13, 2587–2596. doi:10.1016/j.celrep.2015.11.034
- Zechiedrich, E.L., Khodursky, A.B., Bachellier, S., Schneider, R., Chen, D., Lilley, D.M., Cozzarelli, N.R., 2000. Roles of topoisomerases in maintaining steady-state DNA supercoiling in Escherichia coli. *J. Biol. Chem.* 275, 8103–8113.
- Zechiedrich, E.L., Khodursky, A.B., Cozzarelli, N.R., 1997. Topoisomerase IV, not gyrase, decatenates products of site-specific recombination in Escherichia coli. *Genes & Development* 11, 2580–2592.
- Zhao, G., Ceci, P., Ilari, A., Giangiacomo, L., Laue, T.M., Chiancone, E., Chasteen, N.D., 2002. Iron and hydrogen peroxide detoxification properties of DNA-binding protein from starved cells. A ferritin-like DNA-binding protein of Escherichia coli. *J. Biol. Chem.* 277, 27689–27696. doi:10.1074/jbc.M202094200
- Zhou, H., Lutkenhaus, J., 2003. Membrane binding by MinD involves insertion of hydrophobic residues within the C-terminal amphipathic helix into the bilayer. *Journal of Bacteriology* 185, 4326–4335. doi:10.1128/JB.185.15.4326-4335.2003
- Zhu, Q., Pongpech, P., DiGate, R.J., 2001. Type I topoisomerase activity is required for proper chromosomal segregation in Escherichia coli. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98, 9766–9771. doi:10.1073/pnas.171579898

Annexe 1



ELSEVIER



Mechanisms for chromosome segregation

Jean-Yves Bouet^{1,2}, Mathieu Stouf³, Elise Lebailly^{1,2} and François Cornet^{1,2}

Bacteria face the problem of segregating their gigantic chromosomes without a segregation period restricted in time and space, as Eukaryotes do. Segregation thus involves multiple activities, general or specific of a chromosome region and differentially controlled. Recent advances show that these various mechanisms conform to a “pair and release” rule, which appears as a general rule in DNA segregation. We describe the latest advances in segregation of bacterial chromosomes with emphasis on the different pair and release mechanisms.

Addresses

¹ Laboratoire de Microbiologie et de Génétique Moléculaires, CNRS, F-31000 Toulouse, France

² Université de Toulouse, Université Paul Sabatier, F-31000 Toulouse, France

³ Department of Molecular and Cellular Biology, Harvard University, Cambridge, MA 02138, USA

Corresponding author: Cornet, François
(Francois.Cornet@ibcg.biotoul.fr)

Current Opinion in Microbiology 2014, 22:60–65

This review comes from a themed issue on **Growth and development: prokaryotes**

Edited by **Frédéric Boccard**

For a complete overview see the [Issue](#) and the [Editorial](#)

Available online 13th October 2014

<http://dx.doi.org/10.1016/j.mib.2014.09.013>

1369-5274/© 2014 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Introduction

Bacterial chromosomes are giant molecules compared to the size of the bacterial cells. Chromosome segregation closely follows replication and may span most of the cell cycle, starting in young cells and lasting to cytokinesis. It thus involves various activities differentially controlled in time and space. Their description is complicated by the lack of a chromosome compaction step and of defined and exclusive cell cycle phases in most model bacteria.

Segregation involves two crucial steps: the physical separation of sister loci, most often detected as the duplication of fluorescent foci, and their migration to new cellular locations (home position) in compartments corresponding to the future sister cells. In bacteria, these two steps are usually studied as a single global segregation

step, since loci duplication is quickly followed by their migration. Here, we review the mechanism for chromosome segregation with emphasis on the initial physical separation of sister DNA strands. Three global mechanisms emerge: first, bulk chromosome segregation, which concerns all sister sequences immediately after replication; second, separation of the origin regions allowing initiation of chromosome movements; and third, separation of the termini regions coupled to cytokinesis.

Bulk chromosome segregation

Like replication, segregation is progressive and follows the *ori to ter* axis [1–5]. Loci are thus segregated in their order of replication. The time separating replication of a locus from its segregation (cohesion or co-localisation time) varies depending on the locus position and the growth conditions [6,7]. Surprisingly, SMC complexes (MukBEF in *Escherichia coli*) do not seem primarily involved in cohesion [7–9]. Indeed, the persistence of intercatenation links between nascent chromatids appears as the main cohesion factor [8^{**},10,11]. Intercatenation links are resolved by a dedicated type 2 topoisomerase, TopoIV, which activity is controlled by several factors, including SeqA in *E. coli*. SeqA binds hemimethylated DNA behind replication forks, preventing its methylation. Most recent model of cohesion involves protection of nascent strands by SeqA (about 300 kb) inhibiting TopoIV, thus ensuring cohesion [8^{**}]. Differential binding of SeqA may explain cohesion variation in different chromosome regions (i.e. longer in the *ori* region, [12]). Dedicated proteins may also participate in cohesion in specific regions (e.g. MatP, see below).

The global pattern of sister chromosomes restructuring following migration of loci to their home positions differs between bacteria [4,5,13]. The main reason for these differences might originate from the presence and functioning of Par systems (see below). In the absence of Par system, as in *E. coli*, the primary determinant for loci positioning appears to be when and where they are replicated [14,15]. The forces displacing and constraining loci to their home positions are presently unknown. Current hypotheses propose that the natural tendency of sister chromosomes to separate due to entropic forces coupled to the rebuilding of the local compacted structure of the DNA may be sufficient [16–19]. In this view, the presence of self-compacted chromosome domains, as the ones observed in *E. coli* [18,20] may help. A generic model for whole chromosome segregation has been proposed following the observation that the replicated *E. coli* chromosomes

move by successive jerks [21^{**}]. It involves tethers that pair nascent chromatids. Abrupt releases of such tethers due to increasing strength of newly replicated DNA accumulation provoke the segregation jerks. This model highlights the importance of the cohesion step and its timely controlled release. Regions showing longer cohesion controlled by the SeqA/TopoIV, the Par/SMC (*ori* region, see below) or the MatP/FtsK (*ter* region; see below) systems are obvious candidates to act as tether and release systems (Figure 1).

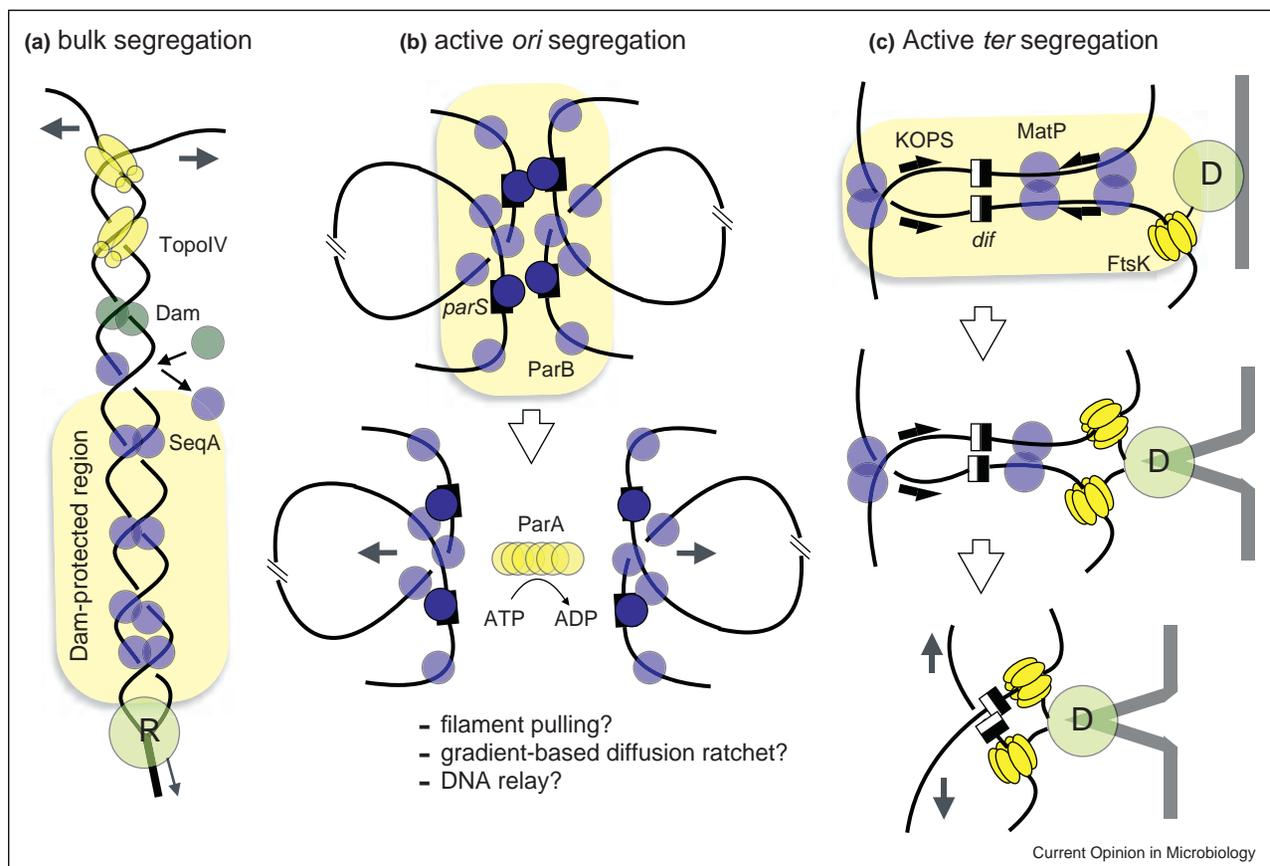
Moving plasmids and chromosomes origins

Most bacterial chromosomes carry ParABS systems, first discovered in plasmids [22]. These consist of three

components: a centromere site on the DNA, a centromere binding protein, and a Walker type ATPase.

ParABS systems (Par) have different implications depending on bacteria and on the replicon type to which they belong. In bacteria carrying one chromosome, Par are often dispensable, except in some transition phases such as the entry in stationary phase [23] or sporulation [24]. In multi-chromosomal bacteria, they are essential to ensure an efficient segregation of each replicon [25,26]. Any case, chromosome-borne Par stabilize low-copy number plasmids when introduced on these latter deprived of their own Par locus, demonstrating

Figure 1



Models of pair and release mechanism for chromosome segregation. Black lines represent chromosomes; Blue circles indicate proteins with pairing activities (highlighted as yellow zones). Yellow circles indicate proteins with release activities. **(a)** The cartoon represents a segment of chromosome replicating. The R circle represents the replisome at the replication fork with direction of replication indicated. Behind the fork, sister chromatids are paired due to intercatenation links and SeqA binding to hemimethylated DNA, which prevents TopoIV activity. Dam competes with SeqA and methylates DNA. This prevents SeqA binding and allows TopoIV to resolve intercatenation links, allowing segregation of sister chromatids (indicated by the grey arrows). **(b)** ParABS system. Top panel: four *parS* sites (two from each sister chromosome) are paired inside a ParB cluster. ParB dimers (blue circles) bind both specific *parS* sites (black bars bound by heavy blue circles) and neighbour non-specific sequences (light blue circles). The ParB cluster is maintained by interactions between ParB dimers. Bottom panel: ParA releases the ParB-dependent pairing by an unknown mechanism, which requires ATP hydrolysis. Three different mechanisms are currently proposed to explain the subsequent migration and positioning (filament pulling, diffusion ratchet or DNA relay, see text). **(c)** MatP/FtsK-dependent *ter* segregation. MatP pairs sister *ter* regions, creating a preferred substrate for FtsK. DNA translocation is activated at the onset of cell division and oriented by KOPS motifs toward *dif*. Translocation removes MatP from the DNA, allowing progressive segregation. Dimer resolution is eventually activated when FtsK reaches the XerCD/*dif* complexes (XerC and D are not represented). Grey line: cell membrane in the process of septation in the middle and lower panels; D circle: the divisome; Black line: sister *ter* regions of a dimeric chromosome; Black and white square: the *dif* site; black arrows: KOPS motifs; Yellow hexamers: FtsK with direction of translocation indicated; Blue circle: MatP dimers.

that they fully function as active partition systems [23,27,28].

The Par-mediated active partition process is a positioning reaction inside the cell, ensuring that partition complexes assembled on sister centromere sites relocate on each side of the septal plane before cell division. This positioning could be either at mid-cell position and quarter-cell position [29,30], as observed for plasmids [31,32], or at polar or sub-polar positions in the case of pole-tethered replication origins [33–35]. The three Par components always locate near the origin of replication [36], therefore actively positioning the first replicated DNA region and orienting segregation of the whole chromosome [33,37].

The *parS* site nucleates the formation of a partition complex by binding ParB with high specificity. This strong interaction is provided by (i) two centromere binding motifs forming an extended centromere binding domain [38] and (ii) the involvement of most, if not all, of the 16 base pairs of *parS* sites [26,36,39]. Cells contain a large excess of ParB dimers compared to *parS* sites [40,41,42^{*}]. The partition complex contains a large number of ParB dimers, some bound specifically to *parS* and some bound near *parS* supposedly by lateral spreading from *parS* [43–45]. Recent studies pointed out that lateral ParB spreading in *B. subtilis* could be limited and partition complexes would involve cooperative bridging and nearest-neighbour interactions between ParB dimers [42^{*},46]. Such partition complex architecture would also explain the pairing activity of ParB dimers that maintain duplicated *parS* in close contact.

The release of partition complexes pairing is mediated by ParA. ParA has a weak intrinsic ATPase activity finely tuned by synergistic ParB and DNA interactions [47–49]. At least in the case of plasmid, ParB stimulation of ATP hydrolysis is necessary for the release of partition complexes pairing [50^{*}], but the underlying mechanism is currently unknown.

In addition to their primary partition activity, Par have evolved some other functions such as mediating replication initiation [51] or loading SMCs [52]. The ParB-mediated recruitment of SMC complexes to the origin is involved in segregation during fast growth, by constraining contiguous *ori*-proximal DNA segments [53,54]. In supplement to ParABS system, this action is proposed to draw the origin region in on itself and away from its sister overcoming factors that maintain origin cohesion [54,55].

The mechanism driving the bidirectional migration of partition complex involves ParA activity in a poorly understood manner. ParA activities are modulated by ATP binding and hydrolysis [56–58]. *In vitro*, the ATP-bound form of some ParAs, from plasmids or

chromosomes, spontaneously forms polymers [59–62]. ParA has an ATP-dependent non-specific DNA binding activity that is essential for partition [60,62–65]. A key feature is thus the chromosome itself, as non-specific DNA mainly takes the form of the nucleoid occupying most of the cytoplasm. Importantly, ParA undergoes a slow conformational transition upon ATP binding [65]. This kinetic provides a time-delay switch allowing slow cycling between the DNA binding and non-binding forms of ParA, and is responsible of the ParB-stimulated patterning of ParAs on the nucleoid (reviewed in [55]). On the basis of these activities, three main models are still competing: (i) ‘filaments pulling’ partition complexes through ParA polymerization [62,66], (ii) ‘ParA gradient’ generating the motive force by a diffusion-ratchet mechanism [67^{**},68^{**}], or (iii) ‘DNA relay’ in which the DNA-associated ParA-ATP dimers could serve as transient tethers that “relay” the partition complex from one DNA region to another [69].

Coupling segregation to cell division

Segregation of the *ter* region has been mostly studied in *E. coli*. Loci of the *ter* region replicate at mid-cell [70] and display an extended cohesion period lasting from termination of replication to the onset of cytokinesis [71^{**}]. This extended cohesion is controlled by the MatP protein, which binds specific *matS* sites restricted to a 0.8 Mb *ter* region [72]. MatP binds DNA as a dimer and forms tetramers via its N-terminal and C-terminal domains, respectively [73^{*}]. Tetramerisation is stimulated by binding to DNA and pairs remote *matS* sites. MatP also interacts with ZapB, a component of the cell division apparatus, via its C-terminal domain [74^{*}]. While tetramerisation of MatP appears important for compacting the *ter* region, its interaction with ZapB is involved in the positioning and the extended cohesion of this region.

The second major player in *ter* segregation, FtsK, has been mostly studied for its role in resolution of chromosome dimers [75]. FtsK localizes to the division septum and is essential for cell division through its N-terminal domain. The C-terminal domain forms a hexameric motor of the AAA+ family [76] involved in DNA segregation by translocating DNA of the *ter* region [77]. Translocation by FtsK and the related SpoIIIE protein wipes off DNA binding proteins, including MatP [78,79]. The extreme C-terminal domain, FtsK γ , controls both the translocation activity and the recombination event required for resolving chromosome dimers, which is catalysed by the XerC and XerD recombinases at the *dif* site (Figure 1c). FtsK γ binds to DNA and imposes the directionality of translocation by recognizing specific motifs oriented toward *dif*, the KOPS [80,81]. Recombination complexes composed of XerCD hetero-tetramers gathering two *dif* sites readily form in absence of FtsK [82,83^{*}]. These complexes are however inactive and require an interaction between FtsK γ and XerD to recombine.

Recent work has revealed that the *ter* region segregates following an accurate sequential pattern, *dif* being the last chromosome locus to be segregated [71**]. FtsK and MatP control this pattern, which occurs independently of chromosome dimers. Chromosome monomers and dimers thus segregate along a common pathway into which MatP promotes cohesion and FtsK translocation releases it (Figure 1c). In this model, MatP pairs sister *ter* regions from replication to the onset of cell division via its cohesion activity and its interaction with ZapB, allowing FtsK to interact specifically with this region. Cell division then activates translocation, potentially by allowing hexamerisation [84**,85]. KOPS-oriented translocation sequentially releases cohesion by removing MatP, allowing progressive segregation driven by sister chromosome reconstruction in the newly formed sister cellular compartments.

Conclusion

Segregation of bacterial genomes uses both general and specific “pair and release” mechanisms. The general mechanism, controlled by temporary cohesion behind replication forks, certainly applies to all replicons. In this view, functional homologs of the SeqA/Dam system are still to be discovered in most bacteria. For specific activities, different mechanisms may be used depending on the types of replicons. FtsK is almost ubiquitous in bacteria and required for segregating both main and secondary chromosomes but not plasmids, when known. Functional homologs of MatP certainly exist outside γ -Proteobacteria and remain to be discovered. On the other hand, Par systems are essential for plasmid and secondary chromosomes segregation, but dispensable or even absent on main chromosomes. The different requirements for these systems thus certainly depend on physical features of the replicons, i.e., size and genome complexity, following rules that remain to be established.

Acknowledgements

We thank the members of the Cornet and Bouet teams for critical reading and helpful discussions.

Research in the Cornet and Bouet teams is funded by the CNRS, University Paul Sabatier, ANR contracts BLAN-1327-01 and BLAN-1316-01, the FEDER Midi-Pyrénées and the ARC. EL was supported by a fellowship from the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche.

References and recommended reading

Papers of particular interest, published within the period of review, have been highlighted as:

- of special interest
 - of outstanding interest
1. Niki H, Yamaichi Y, Hiraga S: **Dynamic organization of chromosomal DNA in *Escherichia coli***. *Genes Dev* 2000, **14**: 212-223.
 2. Bates D, Kleckner N: **Chromosome and replisome dynamics in *E. coli*: loss of sister cohesion triggers global chromosome movement and mediates chromosome segregation**. *Cell* 2005, **121**:899-911.
 3. Nielsen HJ, Li Y, Youngren B, Hansen FG, Austin S: **Progressive segregation of the *Escherichia coli* chromosome**. *Mol Microbiol* 2006, **61**:383-393.
 4. Wang X, Liu X, Possoz C, Sherratt DJ: **The two *Escherichia coli* chromosome arms locate to separate cell halves**. *Genes Dev* 2006, **20**:1727-1731.
 5. Viollier PH, Thanbichler M, McGrath PT, West L, Meewan M, McAdams HH, Shapiro L: **Rapid and sequential movement of individual chromosomal loci to specific subcellular locations during bacterial DNA replication**. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004, **101**:9257-9262.
 6. Youngren B, Nielsen HJ, Jun S, Austin S: **The multifork *Escherichia coli* chromosome is a self-duplicating and self-segregating thermodynamic ring polymer**. *Genes Dev* 2014, **28**:71-84.
 7. Adachi S, Fukushima T, Hiraga S: **Dynamic events of sister chromosomes in the cell cycle of *Escherichia coli***. *Genes Cells* 2008, **13**:181-197.
 8. Joshi MC, Magnan D, Montminy TP, Lies M, Stepankiw N, Bates D: **Regulation of sister chromosome cohesion by the replication fork tracking protein SeqA**. *PLoS Genet* 2013, **9**:e1003673.
 - Most up to date and complete study of post-replicative cohesion using the elegant baby machine set-up. It reveals the interplay between SeqA and TopoIV behind replication forks.
 9. Danilova O, Reyes-Lamothe R, Pinskaya M, Sherratt D, Possoz C: **MukB colocalizes with the *oriC* region and is required for organization of the two *Escherichia coli* chromosome arms into separate cell halves**. *Mol Microbiol* 2007, **65**:1485-1492.
 10. Wang X, Reyes-Lamothe R, Sherratt DJ: **Modulation of *Escherichia coli* sister chromosome cohesion by topoisomerase IV**. *Genes Dev* 2008, **22**:2426-2433.
 11. Lesterlin C, Gigant E, Boccard F, Espéli O: **Sister chromatid interactions in bacteria revealed by a site-specific recombination assay**. *EMBO J* 2012, **31**:3468-3479.
 12. Joshi MC, Bourniquel A, Fisher J, Ho BT, Magnan D, Kleckner N, Bates D: ***Escherichia coli* sister chromosome separation includes an abrupt global transition with concomitant release of late-splitting intersister snaps**. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011, **108**:2765-2770.
 13. Vallet-Gely I, Boccard F: **Chromosomal organization and segregation in *Pseudomonas aeruginosa***. *PLoS Genet* 2013, **9**:e1003492.
 14. Wang X, Possoz C, Sherratt DJ: **Dancing around the divisome: asymmetric chromosome segregation in *Escherichia coli***. *Genes Dev* 2005, **19**:2367-2377.
 15. Lesterlin C, Pages C, Dubarry N, Dasgupta S, Cornet F: **Asymmetry of chromosome replicohores renders the DNA translocase activity of FtsK essential for cell division and cell shape maintenance in *Escherichia coli***. *PLoS Genet* 2008, **4**:e1000288.
 16. Jun S, Mulder B: **Entropy-driven spatial organization of highly confined polymers: lessons for the bacterial chromosome**. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006, **103**:12388-12393.
 17. Wiggins PA, Cheveralls KC, Martin JS, Lintner R, Kondev J: **Strong intranucleoid interactions organize the *Escherichia coli* chromosome into a nucleoid filament**. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010, **107**:4991-4995.
 18. Junier I, Boccard F, Espéli O: **Polymer modeling of the *E. coli* genome reveals the involvement of locus positioning and macrodomain structuring for the control of chromosome conformation and segregation**. *Nucleic Acids Res* 2013 <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkt1005>.
 19. Pelletier J, Halvorsen K, Ha B-Y, Papparcone R, Sandler SJ, Woldringh CL, Wong WP, Jun S: **Physical manipulation of the *Escherichia coli* chromosome reveals its soft nature**. *Proc Natl Acad Sci USA* 2012, **109**:E2649-E2656.
 20. Valens M, Penaud S, Rossignol M, Cornet F, Boccard F: **Macrodomain organization of the *Escherichia coli* chromosome**. *EMBO J* 2004, **23**:4330-4341.

21. Fisher JK, Bourniquel A, Witz G, Weiner B, Prentiss M, Kleckner N: **Four-dimensional imaging of *E. coli* nucleoid organization and dynamics in living cells.** *Cell* 2013, **153**:882-895.
A study of global movements of the chromosomes using fluorescent Hu protein. It reveals both fluorescent waves inside the nucleoid and that segregation occurs by successive jerks of fluorescence towards the cell poles, suggesting successive release of tethers due to accumulating forces.
22. Salje J: **Plasmid segregation: how to survive as an extra piece of DNA.** *Crit Rev Biochem Mol Biol* 2010, **45**:296-317.
23. Godfrin-Estevenson AM, Pasta F, Lane D: **The parAB gene products of *Pseudomonas putida* exhibit partition activity in both *P. putida* and *Escherichia coli*.** *Mol Microbiol* 2002, **43**:39-49.
24. Ireton K, Gunther NW, Grossman AD: **spoOJ is required for normal chromosome segregation as well as the initiation of sporulation in *Bacillus subtilis*.** *J Bacteriol* 1994, **176**:5320-5329.
25. Yamaichi Y, Fogel MA, Waldor MK: **par genes and the pathology of chromosome loss in *Vibrio cholerae*.** *Proc Natl Acad Sci USA* 2007, **104**:630-635.
26. Passot FM, Calderon V, Fichant G, Lane D, Pasta F: **Centromere binding and evolution of chromosomal partition systems in the Burkholderiales.** *J Bacteriol* 2012, **194**:3426-3436.
27. Lin DC-H, Grossman AD: **Identification and characterization of a bacterial chromosome partitioning site.** *Cell* 1998, **92**:675-685.
28. Yamaichi Y, Niki H: **Active segregation by the *Bacillus subtilis* partitioning system in *Escherichia coli*.** *Proc Natl Acad Sci USA* 2000, **97**:14656-14661.
29. Fogel MA, Waldor MK: **Distinct segregation dynamics of the two *Vibrio cholerae* chromosomes.** *Mol Microbiol* 2005, **55**:125-136.
30. Webb CD, Teleman A, Gordon S, Straight A, Belmont A, Lin DC-H, Grossman AD, Wright A, Losick R: **Bipolar localization of the replication origin regions of chromosomes in vegetative and sporulating cells of *B. subtilis*.** *Cell* 1997, **88**:667-674.
31. Gordon GS, Sitnikov D, Webb CD, Teleman A, Straight A, Losick R, Murray AW, Wright A: **Chromosome and low copy plasmid segregation in *E. coli*: visual evidence for distinct mechanisms.** *Cell* 1997, **90**:1113-1121.
32. Niki H, Hiraga S: **Subcellular distribution of actively partitioning F plasmid during the cell division cycle in *E. coli*.** *Cell* 1997, **90**:951-957.
33. Fogel MA, Waldor MK: **A dynamic, mitotic-like mechanism for bacterial chromosome segregation.** *Genes Dev* 2006, **20**:3269-3282.
34. Bowman GR, Comolli LR, Zhu J, Eckart M, Koenig M, Downing KH, Moerner WE, Earnest T, Shapiro L: **A polymeric protein anchors the chromosomal origin/ParB complex at a bacterial cell pole.** *Cell* 2008, **134**:945-955.
35. Harms A, Treuner-Lange A, Schumacher D, Sogaard-Andersen L: **Tracking of chromosome and replisome dynamics in *Myxococcus xanthus* reveals a novel chromosome arrangement.** *PLoS Genet* 2013, **9**:e1003802.
36. Livny J, Yamaichi Y, Waldor MK: **Distribution of centromere-like parS sites in bacteria: insights from comparative genomics.** *J Bacteriol* 2007, **189**:8693-8703.
37. Toro E, Hong SH, McAdams HH, Shapiro L: **Caulobacter requires a dedicated mechanism to initiate chromosome segregation.** *Proc Natl Acad Sci USA* 2008, **105**:15435-15440.
38. Sanchez A, Rech J, Gasc C, Bouet JY: **Insight into centromere-binding properties of ParB proteins: a secondary binding motif is essential for bacterial genome maintenance.** *Nucleic Acids Res* 2013, **41**:3094-3103.
39. Pillet F, Sanchez A, Lane D, Anton Leberre V, Bouet JY: **Centromere binding specificity in assembly of the F plasmid partition complex.** *Nucleic Acids Res* 2011, **39**:7477-7486.
40. Bouet JY, Rech J, Egloff S, Biek DP, Lane D: **Probing plasmid partition with centromere-based incompatibility.** *Mol Microbiol* 2005, **55**:511-525.
41. Funnell BE, Gagnier L: **P1 plasmid partition: binding of P1 ParB protein and *Escherichia coli* integration host factor to altered parS sites.** *Biochimie* 1994, **76**:924-932.
42. Graham TG, Wang X, Song D, Etsen CM, van Oijen AM, Rudner DZ, Loparo JJ: **ParB spreading requires DNA bridging.** *Genes Dev* 2014, **28**:1228-1238.
On the basis of *in vitro* single molecule experiments, this paper shows how ParBs spread into nearby non-specific DNA and assembles into higher-order protein-DNA complexes. Spreading is proposed to be accomplished by looping rather than one-dimensional filamentation, thereby compacting the DNA into an extensively bridged complex.
43. Lynch AS, Wang JC: **SopB protein-mediated silencing of genes linked to the sopC locus of *Escherichia coli* F plasmid.** *Proc Natl Acad Sci USA* 1995, **92**:1896-1900.
44. Murray H, Ferreira H, Errington J: **The bacterial chromosome segregation protein Spo0J spreads along DNA from parS nucleation sites.** *Mol Microbiol* 2006, **61**:1352-1361.
45. Rodionov O, Lobočka M, Yarmolinsky M: **Silencing of genes flanking the P1 plasmid centromere.** *Science* 1999, **283**:546-549.
46. Broedersz CP, Wang X, Meir Y, Loparo JJ, Rudner DZ, Wingreen NS: **Condensation and localization of the partitioning protein ParB on the bacterial chromosome.** *Proc Natl Acad Sci USA* 2014, **111**:8809-8814.
47. Watanabe E, Wachi M, Yamasaki M, Nagai K: **ATPase activity of SopA, a protein essential for active partitioning of F plasmid.** *Mol Gen Genet* 1992, **234**:346-352.
48. Davis MA, Martin KA, Austin SJ: **Biochemical activities of the parA partition protein of the P1 plasmid.** *Mol Microbiol* 1992, **6**:1141-1147.
49. Ah-Seng Y, Lopez F, Pasta F, Lane D, Bouet J-Y: **Dual role of DNA in regulating ATP hydrolysis by the SopA partition protein.** *J Biol Chem* 2009, **284**:30067-30075.
50. Ah-Seng Y, Rech J, Lane D, Bouet JY: **Defining the role of ATP hydrolysis in mitotic segregation of bacterial plasmids.** *PLoS Genet* 2013, **9**:e1003956.
This study on the F-plasmid partition system shows for the first time an uncoupling between the plasmid positioning and the plasmid separation steps. By assaying *in vivo* biochemically characterized ParB deficient mutants in stimulating ATP hydrolysis by ParA, it shows that the stimulation of ATP hydrolysis is involved in plasmid separation but not in plasmid positioning.
51. Murray H, Errington J: **Dynamic control of the DNA replication initiation protein DnaA by Soj/ParA.** *Cell* 2008, **135**:74-84.
52. Gruber S, Errington J: **Recruitment of condensin to replication origin regions by ParB/Spo0J promotes chromosome segregation in *B. subtilis*.** *Cell* 2009, **137**:685-696.
53. Gruber S, Veening J-W, Bach J, Blettinger M, Bramkamp M, Errington J: **Interlinked sister chromosomes arise in the absence of condensin during fast replication in *B. subtilis*.** *Curr Biol* 2014, **24**:293-298.
54. Wang X, Tang OW, Riley EP, Rudner DZ: **The SMC condensin complex is required for origin segregation in *Bacillus subtilis*.** *Curr Biol* 2014, **24**:287-292.
55. Vecchiarelli AG, Mizuuchi K, Funnell BE: **Surfing biological surfaces: exploiting the nucleoid for partition and transport in bacteria.** *Mol Microbiol* 2012, **86**:513-523.
56. Davey MJ, Funnell BE: **Modulation of the P1 plasmid partition protein ParA by ATP, ADP, and P1 ParB.** *J Biol Chem* 1997, **272**:15286-15292.
57. Bouet JY, Funnell BE: **P1 ParA interacts with the P1 partition complex at parS and an ATP-ADP switch controls ParA activities.** *EMBO J* 1999, **18**:1415-1424.
58. Fung E, Bouet JY, Funnell BE: **Probing the ATP-binding site of P1 ParA: partition and repression have different requirements for ATP binding and hydrolysis.** *EMBO J* 2001, **20**:4901-4911.
59. Barillà D, Rosenberg MF, Nobbmann U, Hayes F: **Bacterial DNA segregation dynamics mediated by the polymerizing protein ParF.** *EMBO J* 2005, **24**:1453-1464.

60. Bouet JY, Ah-Seng Y, Benmeradi N, Lane D: **Polymerization of SopA partition ATPase: regulation by DNA binding and SopB.** *Mol Microbiol* 2007, **63**:468-481.
61. Hui MP, Galkin VE, Yu X, Stasiak AZ, Stasiak A, Waldor MK, Egelman EH: **ParA2, a *Vibrio cholerae* chromosome partitioning protein, forms left-handed helical filaments on DNA.** *Proc Natl Acad Sci USA* 2010, **107**:4590-4595.
62. Ptacin JL, Lee SF, Garner EC, Toro E, Eckart M, Comolli LR, Moerner WE, Shapiro L: **A spindle-like apparatus guides bacterial chromosome segregation.** *Nat Cell Biol* 2010, **12**:791-798.
63. Castaing JP, Bouet JY, Lane D: **F plasmid partition depends on interaction of SopA with non-specific DNA.** *Mol Microbiol* 2008, **70**:1000-1011.
64. Hester CM, Lutkenhaus J: **Soj (ParA) DNA binding is mediated by conserved arginines and is essential for plasmid segregation.** *Proc Natl Acad Sci USA* 2007, **104**:20326-20331.
65. Vecchiarelli AG, Han YW, Tan X, Mizuuchi M, Ghirlando R, Biertumpfel C, Funnell BE, Mizuuchi K: **ATP control of dynamic P1 ParA-DNA interactions: a key role for the nucleoid in plasmid partition.** *Mol Microbiol* 2010, **78**:78-91.
66. Ringgaard S, van Zon J, Howard M, Gerdes K: **Movement and equi-positioning of plasmids by ParA filament disassembly.** *Proc Natl Acad Sci USA* 2009, **106**:19369-19374.
67. Hwang LC, Vecchiarelli AG, Han YW, Mizuuchi M, Harada Y, Funnell BE, Mizuuchi K: **ParA-mediated plasmid partition driven by protein pattern self-organization.** *EMBO J* 2013 <http://dx.doi.org/10.1038/emboj.2013.34>.
- This work combines fluorescent microscopy in microfluidic chambers with biochemistry to reconstitute and visualize ParA-mediated plasmid partition. It shows that ParA and ParB transiently bridged plasmid to the DNA carpet (mimicking the nucleoid), and that ParB-stimulated ATP hydrolysis by ParA resulted in ParA disassembly from the bridging complex and from the surrounding DNA carpet.
68. Vecchiarelli AG, Neuman KC, Mizuuchi K: **A propagating ATPase gradient drives transport of surface-confined cellular cargo.** *Proc Natl Acad Sci USA* 2014, **111**:4880-4885.
- Elegant study using a DNA-carpeted flow cell as an artificial nucleoid surface and magnetic beads coated with plasmid partition complexes as surface-confined cargo to reconstitute *in vitro* the F-plasmid partition system. It allows to recapitulate a directed "cargo" motion driven by a surface ATPase gradient.
69. Lim HC, Surovtsev IV, Beltran BG, Huang F, Bewersdorf J, Jacobs-Wagner C: **Evidence for a DNA-relay mechanism in ParABS-mediated chromosome segregation.** *eLife* 2014 <http://dx.doi.org/10.7554/eLife.02758>.
70. Reyes-Lamothe R, Possoz C, Danilova O, Sherratt DJ: **Independent positioning and action of *Escherichia coli* replisomes in live cells.** *Cell* 2008, **133**:90-102.
71. Stouf M, Meile J-C, Cornet F: **FtsK actively segregates sister chromosomes in *Escherichia coli*.** *Proc Natl Acad Sci USA* 2013, **110**:11157-11162.
- This paper shows that segregation of the *ter* region is progressive and ends at the *dif* site. This pattern depends on MatP and FtsK.
72. Mercier R, Petit M-A, Schbath S, Robin S, Karoui El M, Boccard F, Espéli O: **The MatP/matS site-specific system organizes the terminus region of the *E. coli* chromosome into a macrodomain.** *Cell* 2008, **135**:475-485.
73. Dupaigne P, Tonthat NK, Espéli O, Whitfill T, Boccard F, Schumacher MA: **Molecular basis for a protein-mediated DNA-bridging mechanism that functions in condensation of the *E. coli* chromosome.** *Mol Cell* 2012, **48**:560-571.
- An analysis of the structure of MatP revealing its potential cohesin/condensin activity via tetramerisation of MatP dimers bond to remote sites. *In vivo* experiments show that inactivating MatP tetramerisation provoke condensation and segregation defects of the *ter* region.
74. Espéli O, Borne R, Dupaigne P, Thiel A, Gigant E, Mercier R, Boccard F: **A MatP-divisome interaction coordinates chromosome segregation with cell division in *E. coli*.** *EMBO J* 2012, **31**:3198-3211.
- This paper reveals the interaction between MatP and a divisome-associated protein, ZapB. Inactivation of ZapB leads to segregation defects of the *ter* region.
75. Sherratt DJ, Arciszewska LK, Crozat E, Graham JE, Grainge I: **The *Escherichia coli* DNA translocase FtsK.** *Biochem Soc Trans* 2010, **38**:395-398.
76. Massey TH, Mercogliano CP, Yates J, Sherratt DJ, Löwe J: **Double-stranded DNA translocation: structure and mechanism of hexameric FtsK.** *Mol Cell* 2006, **23**:457-469.
77. Deghorain M, Pages C, Meile J-C, Stouf M, Capiaux H, Mercier R, Lesterlin C, Hallet B, Cornet F: **A defined terminal region of the *E. coli* chromosome shows late segregation and high FtsK activity.** *PLoS ONE* 2011, **6**:e22164.
78. Graham JE, Sivanathan V, Sherratt DJ, Arciszewska LK: **FtsK translocation on DNA stops at XerCD-dif.** *Nucleic Acids Res* 2010, **38**:72-81.
79. Marquis KA, Burton BM, Nölmann M, Ptacin JL, Bustamante C, Ben-Yehuda S, Rudner DZ: **SpoIIIE strips proteins off the DNA during chromosome translocation.** *Genes Dev* 2008, **22**:1786-1795.
80. Bigot S, Saleh OA, Lesterlin C, Pages C, Karoui El M, Dennis C, Grigoriev M, Allemand J-F, Barre F-X, Cornet F: **KOPS: DNA motifs that control *E. coli* chromosome segregation by orienting the FtsK translocase.** *EMBO J* 2005, **24**:3770-3780.
81. Levy O, Ptacin JL, Pease PJ, Gore J, Eisen MB, Bustamante C, Cozzarelli NR: **Identification of oligonucleotide sequences that direct the movement of the *Escherichia coli* FtsK translocase.** *Proc Natl Acad Sci USA* 2005, **102**:17618-17623.
82. Diagne CT, Salhi M, Crozat E, Salomé L, Cornet F, Rousseau P, Tardin C: **TPM analyses reveal that FtsK contributes both to the assembly and the activation of the XerCD-dif recombination synapse.** *Nucleic Acids Res* 2013 <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkt1024>.
83. Zawadzki P, May PFJ, Baker RA, Pinkney JNM, Kapanidis AN, Sherratt DJ, Arciszewska LK: **Conformational transitions during FtsK translocase activation of individual XerCD-dif recombination complexes.** *Proc Natl Acad Sci USA* 2013, **110**:17302-17307.
- The FtsK-Xer recombination system was reconstituted in a single molecule set-up. This paper reveals that the XerCD/dif recombination complex forms in absence of FtsK and that FtsK induces conformational changes when reaching this complex to induce recombination.
84. Fiche J-B, Cattoni DI, Diekmann N, Langerak JM, Clerte C, Royer CA, Margeat E, Doan T, Nölmann M: **Recruitment, assembly, and molecular architecture of the SpoIIIE DNA pump revealed by superresolution microscopy.** *PLoS Biol* 2013, **11**:e1001557.
- On the basis of advanced microscopy methods, this study on the recruitment and assembly of the SpoIIIE pump supports a model in which DNA movement occurs through an open pore structurally maintained by the division apparatus, with SpoIIIE working as a checkpoint preventing membrane fusion until completion of chromosome segregation.
85. Bisicchia P, Steel B, Mariam Debela MH, Löwe J, Sherratt D: **The N-terminal membrane-spanning domain of the *Escherichia coli* DNA translocase FtsK hexamerizes at midcell.** *MBio* 2013, **4**:e00800-e813.

Annexe 2

RESEARCH ARTICLE

Mapping Topoisomerase IV Binding and Activity Sites on the *E. coli* Genome

Hafez El Sayyed^{1,2} , Ludovic Le Chat¹ , Elise Lebailly³, Elise Vickridge^{1,2}, Carine Pages³, Francois Cornet³, Marco Cosentino Lagomarsino⁴, Olivier Espéli¹ *

1 Center for Interdisciplinary Research in Biology (CIRB), Collège de France, UMR-CNRS 7241, Paris, France, **2** Université Paris–Saclay, Gif-sur-Yvette, France, **3** Laboratoire de Microbiologie et de Génétique Moléculaires (LMGM), CNRS-Université Toulouse III, Toulouse, France, **4** UMR 7238, Computational and quantitative biology, Institut de biologie Paris Seine, Paris, France

 These authors contributed equally to this work.

* olivier.espeli@college-de-france.fr



CrossMark
click for updates

 OPEN ACCESS

Citation: El Sayyed H, Le Chat L, Lebailly E, Vickridge E, Pages C, Cornet F, et al. (2016) Mapping Topoisomerase IV Binding and Activity Sites on the *E. coli* Genome. *PLoS Genet* 12(5): e1006025. doi:10.1371/journal.pgen.1006025

Editor: Patrick H. Viollier, University of Geneva Medical School, SWITZERLAND

Received: December 11, 2015

Accepted: April 11, 2016

Published: May 12, 2016

Copyright: © 2016 El Sayyed et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: Sequencing data are available on the GEO NCBI server with the accession number GSE75641.

Funding: This work was supported by grants from Agence Nationale de la Recherche, ANR sisters (ANR-10-JCJC-1204-0), and ANR Magisbac (ANR-14-CE10-0007). 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.

Abstract

Catenation links between sister chromatids are formed progressively during DNA replication and are involved in the establishment of sister chromatid cohesion. Topo IV is a bacterial type II topoisomerase involved in the removal of catenation links both behind replication forks and after replication during the final separation of sister chromosomes. We have investigated the global DNA-binding and catalytic activity of Topo IV in *E. coli* using genomic and molecular biology approaches. ChIP-seq revealed that Topo IV interaction with the *E. coli* chromosome is controlled by DNA replication. During replication, Topo IV has access to most of the genome but only selects a few hundred specific sites for its activity. Local chromatin and gene expression context influence site selection. Moreover strong DNA-binding and catalytic activities are found at the chromosome dimer resolution site, *dif*, located opposite the origin of replication. We reveal a physical and functional interaction between Topo IV and the XerCD recombinases acting at the *dif* site. This interaction is modulated by MatP, a protein involved in the organization of the Ter macrodomain. These results show that Topo IV, XerCD/*dif* and MatP are part of a network dedicated to the final step of chromosome management during the cell cycle.

Author Summary

DNA topoisomerases are ubiquitous enzymes that solve the topological problems associated with replication, transcription and recombination. Type II Topoisomerases play a major role in the management of newly replicated DNA. They contribute to the condensation and segregation of chromosomes to the future daughter cells and are essential for the optimal transmission of genetic information. In most bacteria, including the model organism *Escherichia coli*, these tasks are performed by two enzymes, DNA gyrase and DNA Topoisomerase IV (Topo IV). The distribution of the roles between these enzymes during the cell cycle is not yet completely understood. In the present study we use genomic and molecular biology methods to decipher the regulation of Topo IV during the cell cycle.

Here we present data that strongly suggest the interaction of Topo IV with the chromosome is controlled by DNA replication and chromatin factors responsible for its loading to specific regions of the chromosome. In addition, our observations reveal, that by sharing several key factors, the DNA management processes ensuring accuracy of the late steps of chromosome segregation are all interconnected.

Introduction

DNA replication of a circular bacterial chromosome involves strong DNA topology constraints that are modulated by the activity of DNA topoisomerases [1]. Our current understanding of these topological modifications comes from extensive studies on replicating plasmids [2, 3]. These studies suggest that positive supercoils are formed ahead of the replication fork, while precatenanes are formed on newly replicated sister strands. At the end of a replication round, unresolved precatenanes accumulate in the region of replication termination and are converted to catenanes between the replicated sister chromosomes. Neither precatenanes or catenanes have been directly observed on chromosomes but their presence is generally accepted and failure to resolve them leads to chromosome segregation defects and cell death [4].

Topo IV is a type II topoisomerase formed by two dimers of the ParC and ParE subunits and is the main decatenase in *Escherichia coli* [5]. *in vitro*, its activity is 100 fold stronger on catenated circles than that of DNA gyrase [6]. Topo IV activity is dependent on the topology of the DNA substrate; Topo IV activity is strongest on positively supercoiled DNA and has a marked preference for L-braids, which it relaxes completely and processively. Topo IV can also unlink R-braids but only when they supercoil to form L-plectonemes [7–9]. *In vivo*, DNA gyrase appears to have multiple targets on the *E. coli* chromosome [10–12], whereas Topo IV cleavage sites seem to occur less frequently [11]. Interestingly, Topoisomerase IV activity is not essential for replication itself [13] but is critical for chromosome segregation [14]. The pattern of sister chromatid separation has been shown to vary upon Topo IV alteration, leading to the view that precatenanes mediate sister chromatid cohesion by accumulating for several hundred kilobases behind the replication forks keeping the newly replicated DNA together [13, 15]. The regulation of Topo IV and perhaps the accessibility of the protein to chromosome dimers was proposed to be an important factor controlling chromosome segregation [15, 16]. Topo IV activity can be modulated by a number of proteins including MukB and SeqA. MukB, is an SMC-related protein in *E. coli* and is reported to bind to the C-terminus of Topo IV [17] to enhance Topo IV unlinking activities [18, 19]. MukB also appears to be important in favoring the formation of Topo IV foci (clusters) near the origin of replication [20]. SeqA, a protein involved in the control of replication initiation, and Topo IV also interact [21]. These interactions may play a role in sister chromatid segregation at the late segregating SNAP regions near the origin of replication of the chromosome [16].

Beside its role in the resolution of precatenanes, Topo IV is mostly required in the post-replicative (G2) phase of the cell cycle for the resolution of catenation links. Indeed, *Espeli et al.* showed that Topo IV activity is mostly observed during the G2 phase, suggesting that a number of catenation links persist after replication [22]. Recent cell biology experiments revealed that in G2, the terminal region (*ter*) opposite *oriC* segregates following a specific pattern [23–25]. Sister *ter* regions remain associated from the moment of their replication to the onset of cell division. This sister-chromosome association is mediated by the Ter macrodomain organizing protein, MatP [26]. At the onset of cell division, the FtsK DNA-translocase processes this region, releasing the MatP-mediated association. This process ends at the *dif* site, when the

dimeric forms of the sister chromosomes are resolved by the XerC and XerD recombinases. A functional interaction between the MatP/FtsK/XerCD-*dif* system and Topo IV has long been suspected. FtsK interacts with Topo IV, enhancing its decatenation activity *in vitro* [27, 28] and the *dif* region has been reported as a preferential site of Topo IV cleavage [29]. This functional interaction has been poorly documented to date and is therefore remains elusive.

In this study we have used genomic and molecular biology methods to characterize Topo IV regulation during the *Escherichia coli* cell cycle on a genome-wide scale. The present work revealed that Topo IV requires DNA replication to load on the chromosome. In addition, we have identified two binding patterns: i) regions where Topo IV binds DNA but is not engaged in a cleavage reaction; ii) numerous sites where Topo IV cleavage is frequent. We show that Topo IV-mediated removal of precatenanes is influenced by both local chromatin structure and gene expression. We also demonstrate that at the *dif* site, Topo IV cleavage and binding are enhanced by the presence of the XerCD recombinase and the MatP chromosome-structuring factor. The enhancement of Topo IV activity at *dif* promotes decatenation of fully replicated chromosomes and through interaction with other DNA management processes, this decatenation ensures accurate separation of the sister chromosomes.

Results

Topoisomerase IV binding on the *E. coli* chromosome

To identify Topo IV binding, we performed ChIP-seq experiments in ParE and ParC Flag tagged strains. The C-terminus fusions of ParE and ParC replaced the wild-type (WT) alleles without any observable phenotypes (S1 Fig). We performed three independent experiments, two ParE-flag IPs and one ParC-flag IP, with reproducible patterns identified in all three experiments. A Pearson correlation of 0.8, 0.9 and 0.7 was observed for ParC-ParE1, ParE1-ParE2 and ParC-ParE2 respectively. A map of enriched regions observed in each experiment is represented on Fig 1A (red circles). Four of the highly-enriched sites are illustrated at a higher magnification in Fig 1A—right panels. Interestingly one of these sites corresponds to the *dif* site (position 1.58Mb), which has previously been identified as a strong Topoisomerase IV cleavage site in the presence of norfloxacin [29]. We also observed strong enrichment over rRNA operons, tRNA and IS sequences. To address the significance of the enrichment at rRNA, tRNA and IS, we monitored these sites in ChIP-seq experiments performed in the same conditions with a MatP-flag strain and mock IP performed with strain that did not contain any flag tagged protein. Both MatP and Mock IP presented significant signals on rRNA, tRNA and IS loci (S2 Fig). This observation suggested that Topo IV enrichment at rRNA, tRNAs and IS was an artifact of the ChIP-Seq technique. By contrast no enrichment was observed at the *dif* site in the MatP and mock-IP experiments (S2 Fig), we therefore considered *dif* to be a genuine Topo IV binding site and compared every enriched region (>2 fold) with the *dif* IP. We filtered the raw data for regions presenting the highest Pearson correlation with the *dif* signal (>0.7). This procedure discarded many highly enriched regions (Fig 1A orange circles). We identified 19 sites throughout the chromosome where Topo IV IP/input signal suggested a specific binding for at least two of the experiments (Fig 1A, outer circle histogram, S1 Table). Most Topo IV binding sites span a 200 bp region. These sites frequently overlapped intergenic regions, with their mid-points located inside the intergenic region, and did not correlate with any identifiable consensus sequence. In addition to *dif*, which exhibited a 10-fold enrichment, three other sites were strongly enriched. These sites corresponded to positions 1.25Mb (9.4x), 1.85Mb (31x) and 2.56Mb (19x) on the chromosome (Fig 1A, right panels). Beside these specific sites, Topo IV IP showed non-specific enrichment in the *oriC* proximal half of the chromosome. This bias was not a consequence of locus copy number, as the enrichment remained after copy number normalization (Fig 1B). We

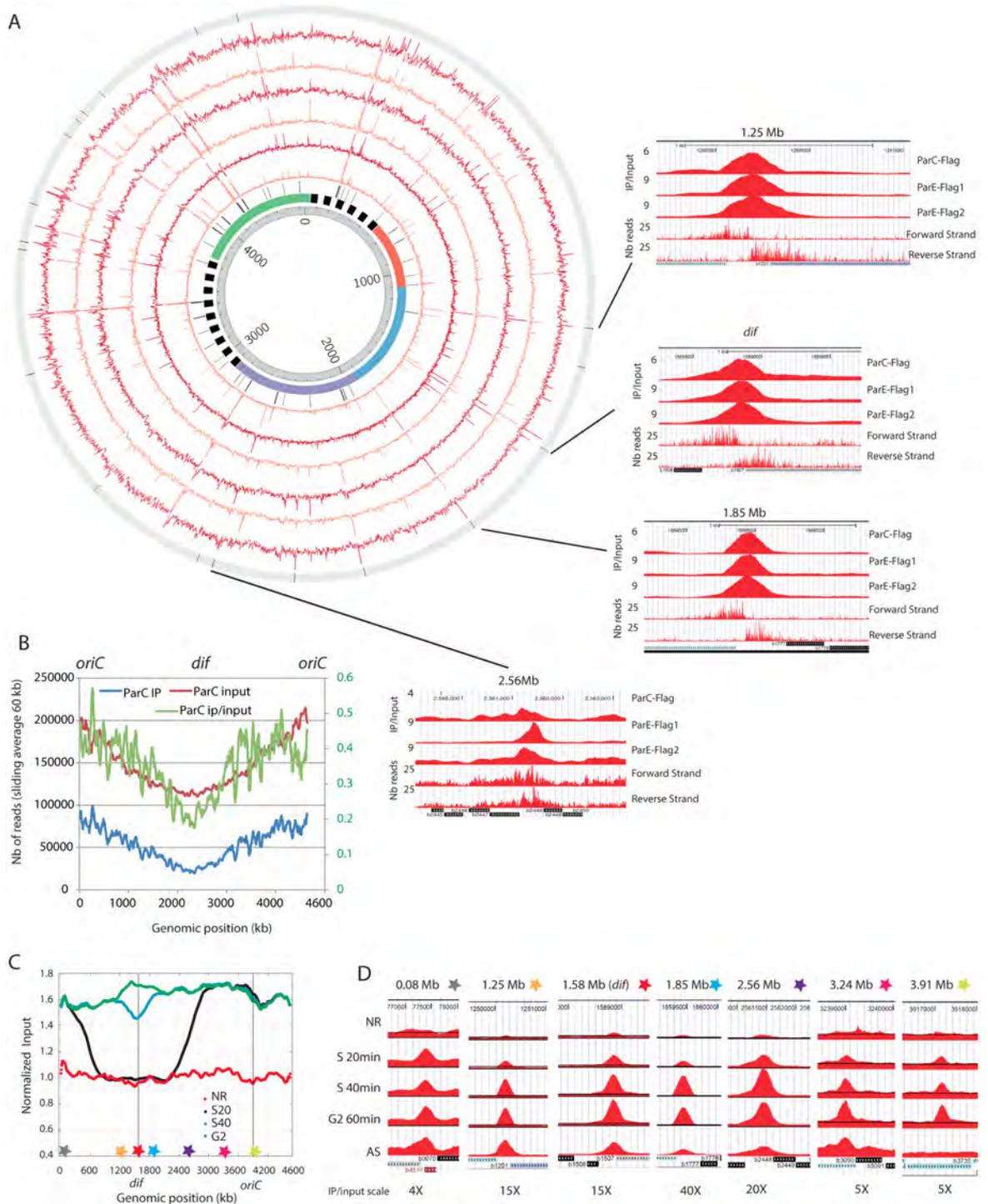


Fig 1. Topo IV binding pattern of replicating chromosome. A) Circos plot of the ChIP-seq experiments for ParC-flag and ParE-flag. The IP / input ratio over the entire *E. coli* genome is presented for three independent experiments, one IP on the *parC-flag* strain and two IPs on the *parE-flag* strain. From the center to the outside, circles represent: genomic coordinates, macrodomain map, position of tRNA genes and ribosomal operons, ParE-Flag 1 ChIP-seq (untreated data, orange), ParE-Flag 1 ChIP-seq (filtered data, red), ParE-Flag 2 ChIP-seq (untreated data, orange), ParE-Flag 2 ChIP-seq (filtered data, red), ParC-Flag ChIP-seq (untreated data, orange), ParC-Flag ChIP-seq (filtered data, red), position of the 19 validated Topo IV binding sites. The right panels represent magnifications for four specific Topo IV binding sites, position 1.25 Mb, position 1.58 Mb (*dif*), position 1.85 Mb and position 2.56Mb. The three first rows correspond to filtered IP/Input ratio for ParC-Flag, ParE-Flag1 and ParE-Flag2 IPs, the

fourth and fifth rows correspond respectively to the forward and reverse raw read numbers of the *parC-flag* experiment. The position and orientation of genes are illustrated at the bottom of each panel. B) Sliding averages of the IP (blue, left Y axis), Input (red, left Y axis) and IP/input (green, right Y axis) data for the *parC-flag* experiment over 60 kb regions along the genome. To facilitate the reading, *oriC* is positioned at 0 and 4.639 Mb. C) Analysis of Topo IV binding during the bacterial cell cycle. Marker frequency analysis was used to demonstrate the synchrony of the population at each time point. Stars represent the position of the selected Topo IV sites. D) IP/input ratio for 7 regions presenting specific Topo IV enrichment during S and G2 phases. For each genomic position the maximum scale is set to the maximum IP/Input ratio observed.

doi:10.1371/journal.pgen.1006025.g001

used MatP-Flag IP [30] and a control IP in a strain that does not contain a Flag tagged gene to differentiate non-specific Topo IV binding from experimental noise (S3A Fig). In addition, Topo IV enrichment was also observed in GC rich regions of the chromosomes (S3B Fig). Importantly, the *ori/ter* bias was not a result of the GC% bias along the chromosome since it was still explicit after GC% normalization (S3C Fig). More precisely, the Topo IV binding pattern closely followed gene dosage for a ~3Mb region centered on *oriC* (S3D and S3E Fig and S1 Text). In the complementary *ter*-proximal region, gene dosage (input reads) was higher than the ChIP-seq profile, suggesting that the nonspecific Topo IV binding was lower or lasts for a shorter time in the cell cycle (since these data are population-averaged). The Terminus region that is depleted in Topo IV binding (1.6Mb) surpassed, by far, the size of the Ter macrodomain (800kb).

Topo IV binding is influenced by replication

The influence of Topo IV on sister chromatid interactions [15] prompted the question of how Topo IV would follow replication forks and bind to the newly replicated sister chromatids throughout the cell cycle. We performed ChIP-seq experiments in *E. coli dnaC2* strains under conditions suitable for cell cycle synchronization of the entire population. Synchronization was achieved through a double temperature shift, as described previously [15]. Using these conditions, in each cell, S phase is initiated on one chromosome, lasts for 40–45 min and is followed by a G2 phase (20 min) (S4 Fig). We analyzed ParE binding before the initiation of replication, in S phase 20 min (S20) and 40 min (S40) after the initiation of replication and in G2 phase. The synchronization of replication in the population was monitored by marker frequency analysis of the Input DNA (Fig 1C). The profile observed for bacteria that did not replicate at non-permissive temperature was strictly flat, but the S20 replication profile presented two sharp changes of the marker frequency slope around positions 500kb and 2700kb. This suggested that each replication fork had crossed approximately 1000 to 1300 kb in 20 min. The S40 replication profile demonstrated that most cells had finished replication, with the unreplicated region being limited to 300 kb around *dif* in no more than 20% of the bacteria. In G2 phase the marker frequency was flat. We used flow cytometry to demonstrate that at G2, the amount of DNA in each bacterium was double compared to that of the G1 bacteria, indicating that cytokinesis has not yet occurred (S4 Fig). We analyzed Topo IV binding at specific binding sites (Fig 1D). Binding at these sites was strongly impaired in the absence of replication. Binding at every site started in the S20 sample and was maximal in the S40 or G2 samples, without showing any marked decrease, even in the *oriC*-proximal region. These observations suggest that Topo IV binds to specific sites during S phase. However, since enrichment was observed for non-replicated loci and was maintained for a long time after replication, it was not compatible with a model of Topo IV migration with the replication forks. Synchronization experiments with a higher temporal resolution are required to clarify this observation.

Only certain Topo IV binding sites correspond to Topo IV cleavage sites

To measure Topo IV cleavage at the binding sites, we took advantage of the fact that norfloxacin covalently links Topoisomerase II to the gate segment of DNA and prevent its relegation

[31]. We first monitored Topo IV activity on the Topo IV enriched regions (1.2, 1.8, 2.5, 3.2 Mb and *dif*) by incubating bacteria with norfloxacin for 10 minutes before genomic extraction and performing Southern blot analysis to detect the cleaved DNA products [10, 29]. This revealed cleavage fragments induced by both DNA Gyrase and Topo IV poisoning in the WT strain, but only Topo IV cleavage in a *nalR* strain where DNA Gyrase is resistant to norfloxacin. Among the 5 tested sites, only two displayed clear Topo IV cleavage at the expected position (Fig 2A). As expected, the *dif* site exhibited strong cleavage. Moreover cleavage was also observed at position 2.56 Mb. However the 1.2, 1.8 and 3.2 Mb sites did not show any Topo IV mediated cleavage in the presence of norfloxacin.

Topo IV presents hundreds of cleavage sites on the chromosome

The above result prompted us to investigate Topo IV cleavage at the genome-wide scale. We performed IPs in the presence of norfloxacin as a crosslinking agent instead of formaldehyde. Following this step, all downstream steps of the protocol were identical to that of the ChIP-Seq assay. We referred to this method as NorflIP. The NorflIP profile differed from the ChIP-seq profile (Fig 2B). Regions immunoprecipitated with Topo IV-norfloxacin cross-links were frequently observed (Fig 2C orange circle). Similarly to the ChIP-seq experiments, the NorflIP profile revealed strong enrichment over the rRNA operons and IS sequences but not at the tRNA genes (S5A Fig). We used a Southern blot cleavage assay to demonstrate that these signal did not correspond to Topo IV cleavages (S5B Fig). The NorflIP peaks correspond to a ~170 bp forward and reverse enrichment signal separated by a 130 bp segment, which is not enriched. This pattern is the consequence of the covalent binding of Topo IV to the 5' bases at the cleavage site. After Proteinase K treatment the cleaving tyrosine residue bound to the 5' extremity resulted in poor ligation efficiency and infrequent sequencing of the cleaved extremities. (S6A and S6B Fig) This observation confirmed that we were observing genuine Topoisomerase cleavage sites. We used this pattern to define an automatic peak calling procedure (S6C Fig) that identified between 134 and 458 peaks in the three NorflIP experiments, two experiments performed with ParC-Flag and one with ParE-Flag (Fig 2C purple circles and Fig 2D). We observed a total of 571 possible sites in the three experiments with about half of the sites common to at least two experiments and approximately 88 sites common to all three experiments (S1 Table). We analyzed sequencing reads for the three experiments around the *dif*, 0.2 Mb and 1.92Mb positions. It revealed abrupt depletions of forward and reverse reads in a 100bp center region suggesting that it corresponds to the site of cleavage. We extrapolated this result for every peak to estimate the cleavage positioning of Topo IV (~150bp downstream of the center of the forward peak, S6D Fig) We manually validated 172 sites that were common to ParC-1 and ParE-1 experiments (S1 Table) for further analysis.

Characteristics of Topo IV cleavage sites

The Topo IV cleavage at the *dif* site was the most enriched of the chromosome (~ 30 fold), fourteen sites were enriched from 5 to 10 fold and other positions were enriched from 2 to 5 fold (Fig 2E). Most NorflIP sites did not correspond to significant peaks in the ChIP-seq experiment (Fig 2E). We also did not observe any cleavage for the majority of the strong binding sites observed by ChIP-seq. This is illustrated for the binding site at 1.85 Mb (Fig 2E). We verified several Topo IV cleavage sites by Southern blot, a significant cleaved DNA fragment was observed at the expected size for each of them (Fig 2F). Southern blotting experiments following DNA cleavage in the presence of norfloxacin on synchronized cultures revealed that, like its binding, Topo IV cleavage is coordinated with DNA replication. In good agreement with

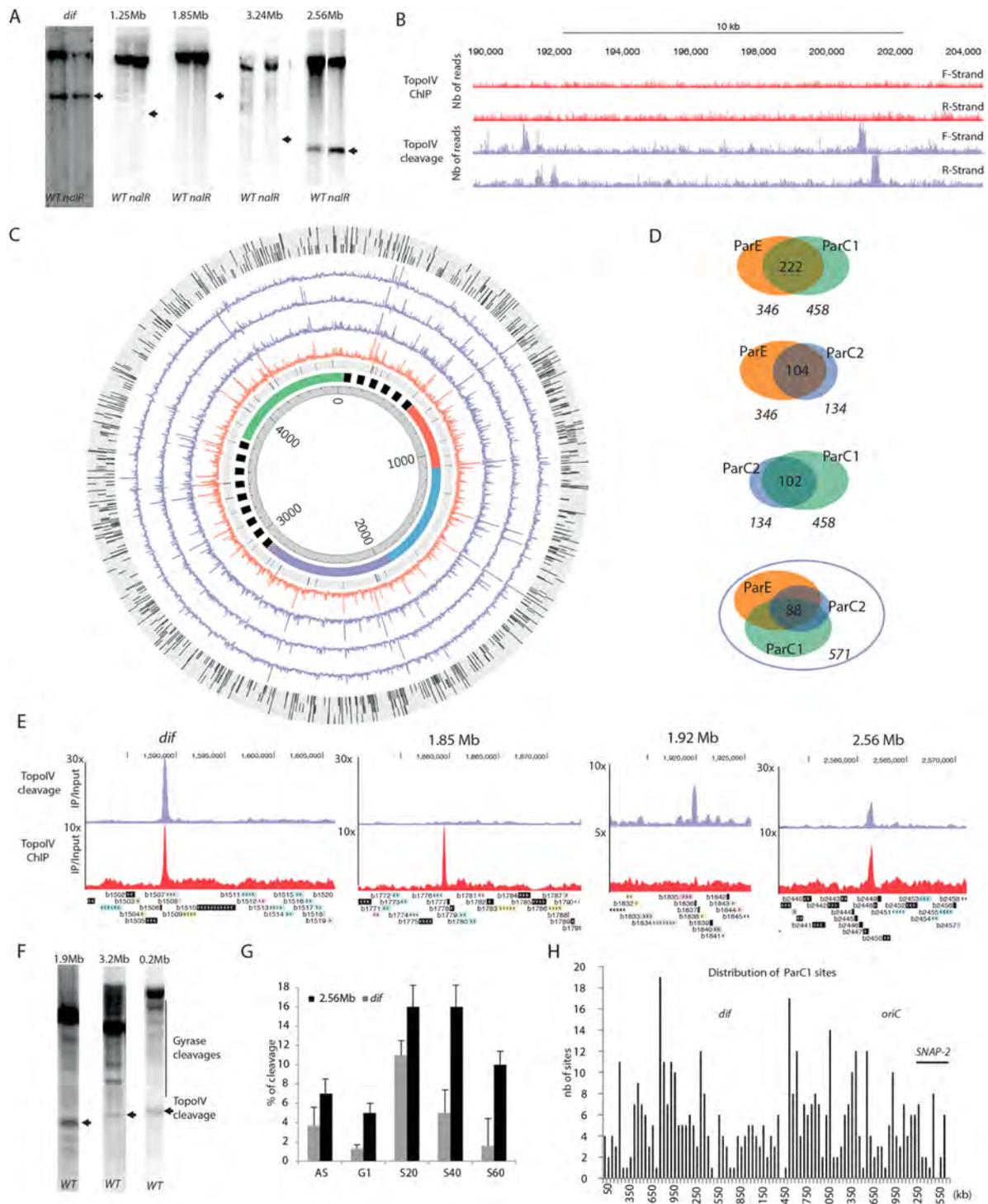


Fig 2. Topo IV cleavage at the Topo IV binding sites. A) Norfloxacin mediated DNA cleavage revealed by Southern blot with a radiolabeled probe near the *dif* site, the 1.25 Mb, 1.85 Mb, 2.56 Mb and the 3.24 Mb site. The size of the expected fragment generated by Topo IV cleavage is marked by an arrow. Topo IV cleavage can be differentiated from gyrase cleavages because of their presence in a *nalR* strain. B) Genome browser image of a 15kb region representative of Topo IV cleavage frequency (purple). These cleavage sites are not correlated with Topo IV enrichment in the ChIP-seq experiments described in Fig 1 (red). C) Circos plot of the NorfIIP experiments. From the center to the outside, circles represent: genomic coordinates, macrodomain map, position of

tRNA genes and ribosomal operons, ParC-Flag 1 NorfIIP (untreated data, orange), ParC-Flag 1 NorfIIP (filtered data, purple), ParE-Flag NorfIIP (filtered data, purple), ParC-Flag 2 NorfIIP (filtered data, purple), validated TopoIV sites present in the ParC-Flag 1, ParE-Flag and ParC-Flag 2 experiments. For visualization purpose, the maximum scale of NorfIIP data has been fixed to an IP/input ratio of 10. D) Peak calling procedure, dedicated to DNA cleavage mediated by TopoIV in the presence of norfloxacin (S6 Fig), revealed 571 sites in total, in three experiments. Venn diagrams of common Topo IV cleavage sites in two experiments. About 200 common sites are observed in each pair of experiments. E) Genome browser zooms on the *dif*, 1.85, 1.92 and 2.56 Mb regions for Topo IV cleavage (purple) and Topo IV binding revealed by ChIP-seq (red). F) DNA cleavage mediated by TopoIV in the presence of norfloxacin revealed by Southern blot with a radiolabeled probe at 0.02, 1.92 Mb and the 3.2 Mb sites. G) Cleavage experiments performed on synchronized cultures, revealed a replication dependency (AS asynchronous, NR not replicating, S20 20 min after the initiation of replication (IR), S40 40 min after IR, S60 60 min after IR. H) Distribution of the ParC-Flag 1 NorfIIP validated sites on the genome by 50 kb bins.

doi:10.1371/journal.pgen.1006025.g002

ChIP-seq experiments, increased cleavage was observed as soon as 20 minutes after initiation of replication for the *dif* and 2.56 Mb sites (Fig 2G).

Genomic distribution of Topo IV cleavage sites

The general genomic distribution of Topo IV cleavage sites was not homogeneous; a few regions had a large number of sites clustered together, while the 1.2Mb– 2.5 Mb region contained a low density of sites (Fig 2H). We further analyzed the distribution of cleavage sites in the terminus and the *oriC* regions. In the terminus region, the average distance of consecutive cleavage sites was long (around 30 kb in the 1.5–2.5 Mb region) compared to 8 kb in the 0.8–1.5 Mb or the 2.5–3.1 Mb regions (S7A Fig). The *oriC* region displays a mixed distribution (S7B Fig), a high density of sites near *oriC* flanked by two depleted regions, including the SNAP2 region [16]. At the gene scale, the mid-point of Topo IV cleavage signal can be localized inside genes (82%) or intergenic regions (16%) but it presents a bias toward the 5' or 3' gene extremities (S7C Fig). Since the cleavage signal spans approximately 200bp, nearly 50% of the sites overlapped, at least partly, with intergenic regions that account for only 11% of the genome. Finally, we did not identify any robust consensus between sets of Topo IV cleavage sites. The only sequence traits that we identified are a bias for GC dinucleotides near the center of the sites (S7D Fig) and an increased spacing of GATC motifs around cleavage sites (S7E Fig).

Targeting of Topo IV cleavage activity is influenced by local environment

The bias in the distribution of cleavage sites (Fig 2H) was very similar to the Topo IV binding bias revealed by ChIP-seq (Fig 1C). NorfIIP and ChIP-seq data were compared on Fig 3A. Despite the lack of corresponding ChIP-seq enrichment at the position of most highly enriched NorfIIP sites, a number of consistencies were observed between these two data sets. Overall the NorfIIP and ChIP-seq datasets had a Pearson correlation of 0.3 and the averaged data (1 kb bin) revealed a Pearson correlation of 0.5. First a small amount of local enrichment in the ChIP-seq experiments was frequently observed in the regions containing many cleavage sites (Fig 3A and 3C). This led us to consider that trapped Topo IV engaged in the cleavage reaction could contribute to a small amount of local enrichment in the ChIP-seq experiments. Second, both Topo IV cleavages and binding sites were rare in highly expressed regions (Fig 3A), only one of the 172 manually validated Topo IV cleavage site overlapped a highly expressed region. However cleavages sites were more frequently, than expected for a random distribution, observed in their vicinity (Fig 3C and S8 Fig). Thirty percent (50/172) of the Topo IV sites are less than 2 kb away from the next highly expressed transcription unit (Fig 3).

We explored correlations between the localization of Topo IV cleavages and binding sites of various NAPs thanks to the Nust database and tools [32]. A significant correlation was only observed for Fis binding sites (Fig 3B). Sixty eight genes present both Fis binding [33] and Topo IV cleavage (P value 2×10^{-03}). Thirty-three of the 172 manually validated cleavage sites

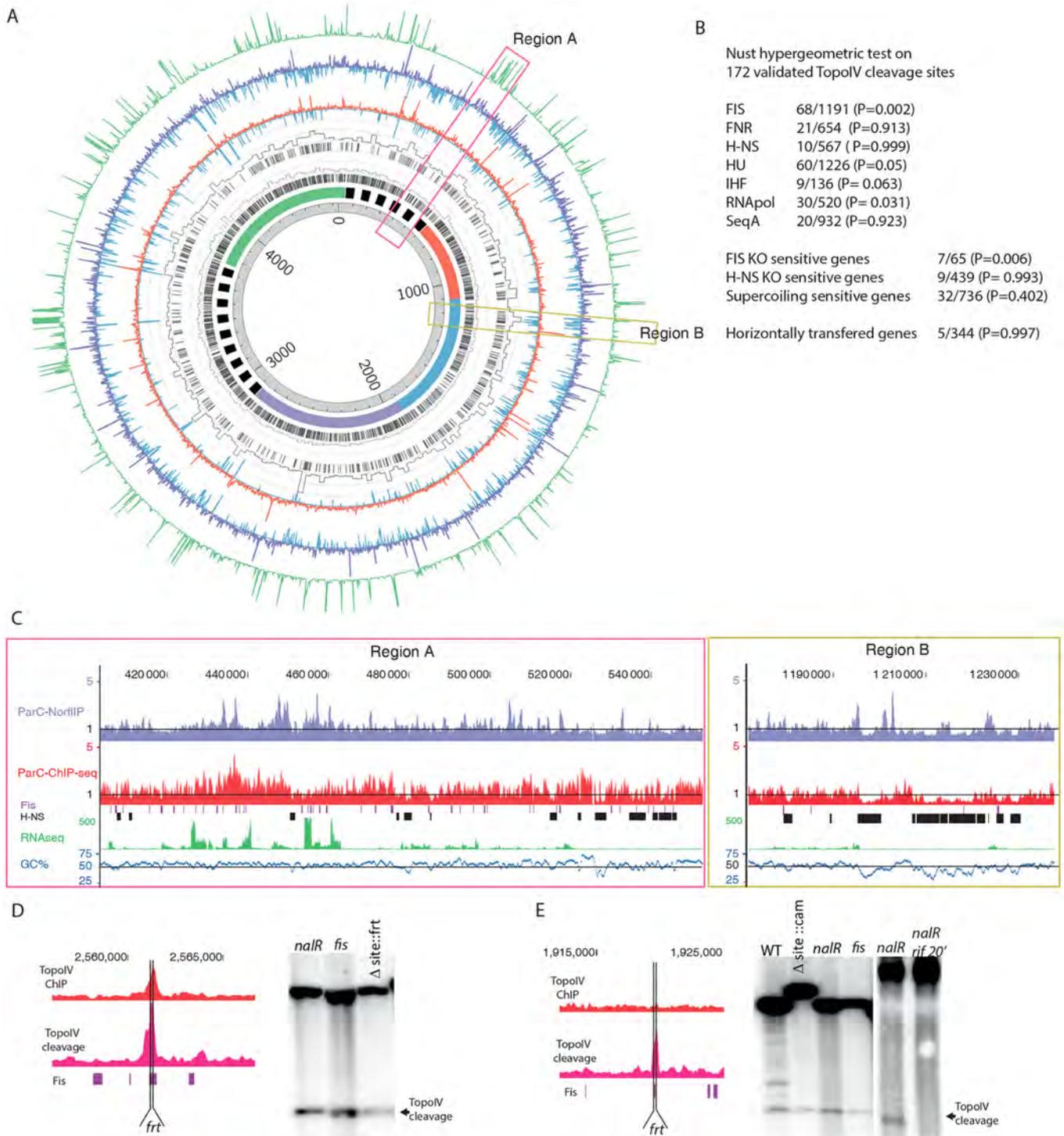


Fig 3. Targeting Topo IV cleavage sites along the *E. coli* genome. A) Circos plot of the ParC-Flag ChIP-seq and ParC-Flag 1 NorflIP experiments. From the center to the outside, circles represent: genomic coordinates, macrodomain map, Fis binding sites in mid exponential phase, % of bases bound by Fis per 20 kb windows of genomic DNA, H-NS binding sites in mid exponential phase, % of bases bound by H-NS per 20 kb windows of genomic DNA [33], ParC-Flag ChIP-seq (depleted regions blue, IP/input <1), ParC-Flag ChIP-seq (enriched regions red, IP/input >1), ParC-Flag 1 NorflIP (depleted regions blue, IP/input <1), ParC-Flag 1 NorflIP (enriched regions red, IP/input >1), gene expression data (RNA-seq results performed in the ChIP-seq and NorflIP conditions). For visualization purpose, the maximum scale of RNAseq data has been fixed to 500 reads which

approximately corresponds to the 400 transcription units that were the most expressed (the distribution of read counts scaled from 0 to 30 000). B) Correlation between the localization of Topo IV cleavages and chromatin markers. The NUST [32] hypergeometric test was used to compare Topo IV and chromatin markers localization. The set of 172 validated Topo IV cleavage sites was used. The number of common localizations over the total number of chromatin marker localization is indicated. The P value of a Fisher's exact test is indicated. C) Genome browser magnifications of the panel A's pink and yellows regions. Mid log phase Fis and H-NS binding sites are respectively indicated with burgundy and black boxes [33]. D) Magnification of the 2.56 Mb Topo IV binding and cleavage site that overlaps a Fis binding site. The position of the deleted Topo IV site is marked by vertical lines (*frt*). Southern blot analysis of Topo IV cleavage at the 2.56 Mb locus, in the *nalR* strain, the *nalR* strain with a deletion of the Topo IV cleavage and binding site and the deletion of *fis*. E) Same as D for the 1.92 Mb Topo IV cleavage site. Southern blot analysis of Topo IV cleavage at the 1.92 Mb locus, in the WT, the *nalR* strain, the *nalR* strain with a deletion of the Topo IV cleavage and Fis binding site and the *nalR* strain with *fis* deletion. The cleavage was also analyzed following a 20 min treatment with rifampicin (*rif*).

doi:10.1371/journal.pgen.1006025.g003

overlapped at least partially with a Fis binding site, 80 of them are located less than 400 bp away from a Fis binding site. At the genome scale this correlation is difficult to observe (Fig 3A), but close examination clearly revealed overlapping Topo IV cleavages and Fis binding sites (Fig 3C). Fis binding sites are more numerous than Topo IV cleavage sites, therefore a large number of them do not present enrichment for Topo IV (Fig 3C). By contrast, Topo IV peaks are excluded from H-NS rich regions (Fig 3A, 3B and 3C). Only one of the 172 manually validated Topo IV cleavage site overlapped with an H-NS binding site. As observed for highly expressed regions Topo IV cleavage sites were frequently observed at the border of H-NS rich regions (Fig 3C). Moreover H-NS rich regions contain less Topo IV than the rest of the chromosome (Fig 3A–3D and S9A Fig). H-NS rich regions correspond to an AT rich segment of the chromosome (Fig 3C and 3D). Indeed background level of Topo IV binding and cleavage were significantly reduced in AT rich regions (S9B Fig). In rare occasions binding of H-NS has been observed in regions with a regular AT content (Fig 3C), notably Topo IV binding and cleavage were also reduced in these regions. This observation suggested that H-NS itself rather than AT content limits the accessibility of Topo IV to DNA. This observation was confirmed by the identification of Topo IV cleavage in regions with an AT content ranging from 20 to 80% (S9C and S9D Fig).

We performed Southern blot analysis of Topo IV cleavage on representative sites to test whether gene expression and chromatin factors influenced Topo IV site selection. First, we observed that the exact deletion of cleavage sites at position 1.92 Mb and 2.56 Mb did not abolish Topo IV cleavage activity (Fig 3D and 3E). Second, since these loci also contain a Fis binding site overlapping Topo IV cleavage signal, we deleted the *fis* gene. However, deletion of the *fis* gene did not modify Topo IV cleavage (Fig 3D and 3E). Finally we performed cleavage assays in the presence of rifampicin to inhibit transcription. To limit the pleiotropic effects of rifampicin addition we performed the experiment with a 20 min pulse of rifampicin. Rifampicin treatment abolished Topo IV cleavage (Fig 3E). These results suggest that gene expression rather than chromatin factors influences Topo IV targeting.

XerC targets Topo IV to the *dif* site

Our analysis confirms that the *dif* region is a hot spot for Topo IV activity [29]. Indeed, ChIP-seq and NorflIP show that Topo IV binds to and cleaves frequently in the immediate proximity of *dif*. We measured DNA cleavage by Topo IV in the presence of norfloxacin in various mutants affecting the structure of *dif* or genes implicated in chromosome dimer resolution. Southern blot was used to measure Topo IV cleavage (Fig 4A). We observed that exact deletion of *dif* totally abolished Topo IV cleavage. Interestingly, the deletion of the XerC-binding sequence (XerC box) of *dif* was also sufficient to abolish cleavage, while the deletion of the XerD box only had a weak effect. Deletion of the *xerC* and *xerD* genes abolished Topo IV cleavage at *dif*. However, cleavage was restored when the catalytically inactive mutants XerC K172A or XerC K172Q were substituted for XerC (Fig 4B). This suggests that the role of XerCD/*dif* in

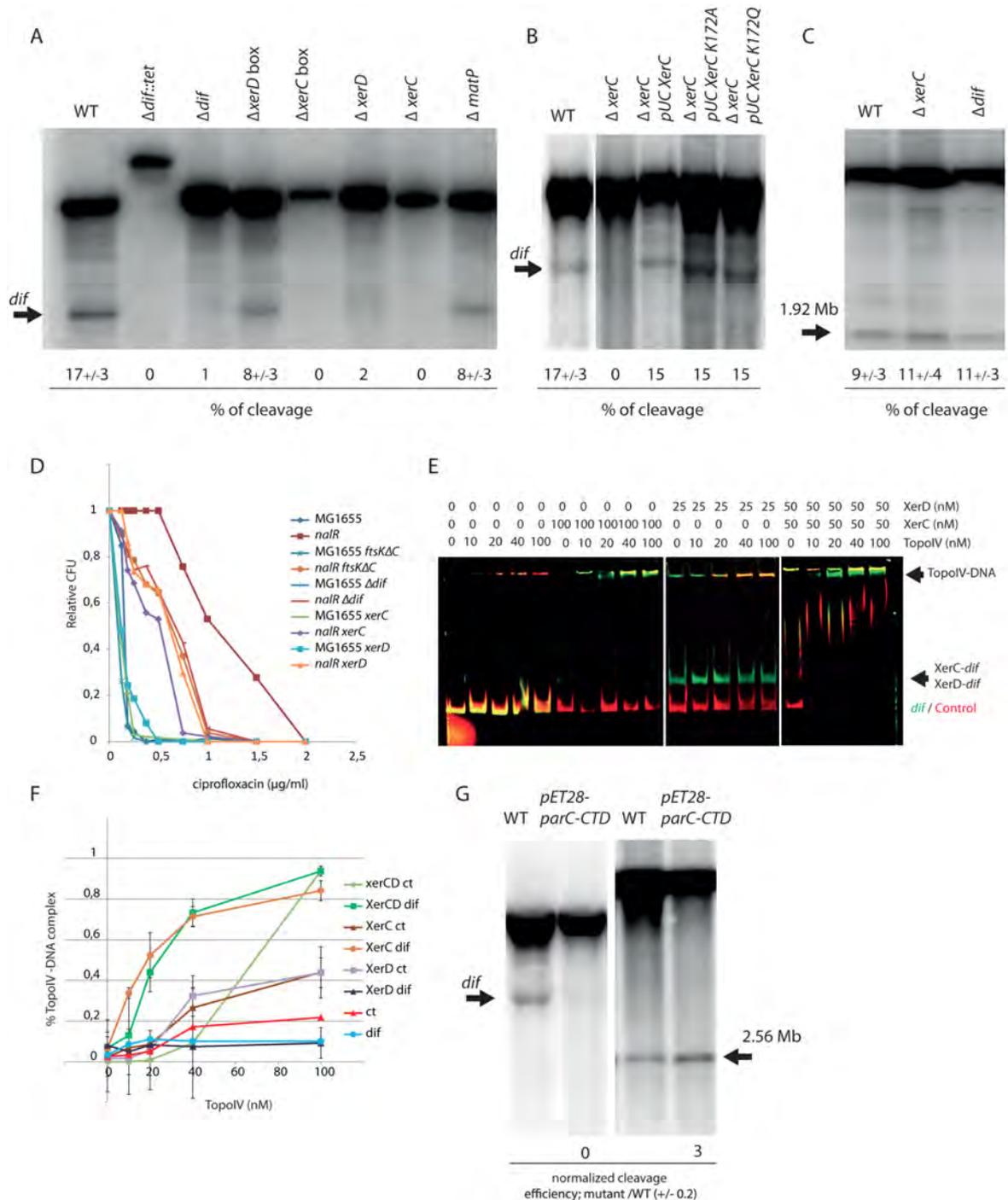


Fig 4. Determinants of Topo IV activity at *dif*. A) Southern blot analysis of the Topo IV cleavage at the *dif* site. Genomic DNA extracted from WT, $\Delta dif::Tc$, Δdif , $\Delta xerD$ box, $\Delta xerC$ box, $\Delta xerD$, and $\Delta xerC$ strains was digested by *Pst*I; the size of the fragment generated by Topo IV cleavage at *dif* is marked by an arrow. The average percentage of cleavage observed in two independent experiments is presented. B) Southern blot analysis of the Topo IV cleavage at the *dif* site. Genomic DNA extracted from WT, $\Delta xerC$, $\Delta xerC$ pUCxerC, $\Delta xerC$ pUCxerCK172A, $\Delta xerC$ pUCxerCK172Q strains was digested with *Pst*I; the size of the cleaved fragment in *dif* is marked by an arrow. C) Topo IV cleavage at the 1.9Mb site in the WT, $\Delta xerC$ and Δdif . D) Plating of *parEts*, *parEts xerC*, *parEts xerD* and *parEts recN* mutants at 30 and 37°C. E) Colony Forming Unit (CFU) analysis of the WT and *nalR* strains deleted for the *dif* site, the *xerC*, *xerD* genes or the C-terminal domain of FtsK in the presence of ciprofloxacin. F) EMSA on a 250 bp CY3 probe containing *dif* (green) and a 250 bp CY5 control probe (red). The amount of Topo IV, XerC or XerD proteins present

in each line is indicated above the gel. G) Quantification of Topo IV EMSA presented in C, data are an average of three experiments. H) Southern blot analysis of Topo IV cleavage at *dif* and position 1.92Mb in a strain overexpressing the C-terminal domain of ParC.

doi:10.1371/journal.pgen.1006025.g004

the control of Topo IV activity is structural and independent of XerCD catalysis. Deletion of *dif* or *xerC* did not significantly alter cleavage at any of the other tested Topo IV cleavage sites (Fig 4C). This suggests that influence of XerC on Topo IV is specific to *dif*.

To evaluate the role of XerCD-mediated Topo IV cleavage at *dif*, we attempted to construct *parEts xerC*, *parEts xerD* and *parCts xerC* double mutants. We could not obtain *parCts xerC* mutants by P1 transduction at any tested temperature. We obtained *parEts xerC* and *parEts xerD* mutants at 30°C. The *parEts xerC* double mutant presented a growth defect phenotype at 30°C and did not grow at temperature above 35°C (Fig 4D). The *parEts xerD* mutant presented a slight growth defect at 37°C compared to *parEts* or *xerD* mutants. None of the *parEts* mutant grew above 42°C. Next, we used quinolone sensitivity as a reporter of Topo IV activity. To this aim, we introduced mutants of the FtsK/Xer system into a *gyrA^{nalR}* (*nalR*) strain; Topo IV is the primary target of quinolones in such strains. The absence of XerC, XerD, the C-terminal activating domain of FtsK or *dif* exacerbated the sensitivity of the *nalR* strain to ciprofloxacin (Fig 4D). We therefore concluded that the impairment of Topo IV was more detrimental to the cell when the FtsK/Xer system was inactivated. Among partners of the FtsK/Xer system the absence of XerC was significantly the most detrimental, suggesting a specific role for XerC in this process.

The above results suggest an interaction between Topo IV and the XerCD/*dif* complex. We therefore attempted to detect this interaction directly *in vitro* (Fig 4E and 4F). We performed EMSA with two fluorescently labeled linear probes, one containing *dif* and the other containing a control DNA not targeted by Topo IV in our genomic assays. Topo IV alone bound poorly to both probes ($K_d > 100\text{nM}$). Binding was strongly enhanced when XerC or both XerC and XerD were added to the reaction mix. In contrast, Topo IV binding to *dif* was slightly inhibited in the presence of XerD alone. These results were consistent with the observation that deletion of the XerC box but not of the XerD box inhibited Topo IV cleavage at *dif* and pointed to a specific role for XerC in Topo IV targeting. The control fragment showed that these effects are specific to *dif*. Topo IV-XerC/*dif* complexes were stable and resisted a challenge by increasing amount of XerD (S10A Fig). The positive influence of XerCD on TopoIV binding was also observed on a negatively supercoiled plasmid containing *dif*. In the presence of XerCD (50nM), a delay in the plasmid migration was observed with 40nM of TopoIV. By contrast, 200 nM was required in the absence of XerCD (S10B Fig). The Southern blot cleavage assay showed that overexpression of the ParC C-terminal domain (pET28parC-CTD) strongly reduced cleavage at *dif* but enhanced cleavage at the Topo IV site located at 2.56Mb. This suggested that, as observed for MukB [17], Topo IV might interact with XerC through its C-terminal domain (Fig 4G).

Topo IV activity at *dif* depends on dynamics of the *ter* region and chromosome circularity

We assayed the effects of the reported Topo IV modulators and proteins involved in chromosome segregation the activity of Topo IV at *dif*. MukB has previously been shown to influence the activity of Topo IV [17, 18]. We measured Topo IV cleavage in a *mukB* mutant at *dif* and at position 2.56 Mb, cleavage was reduced at *dif* but no significant effect was observed at position 2.56Mb (Fig 5A). We did not detect any effect of a *seqA* deletion on Topo IV cleavage at either position (Fig 5B). We next assayed the effect of MatP, which is required for compaction and

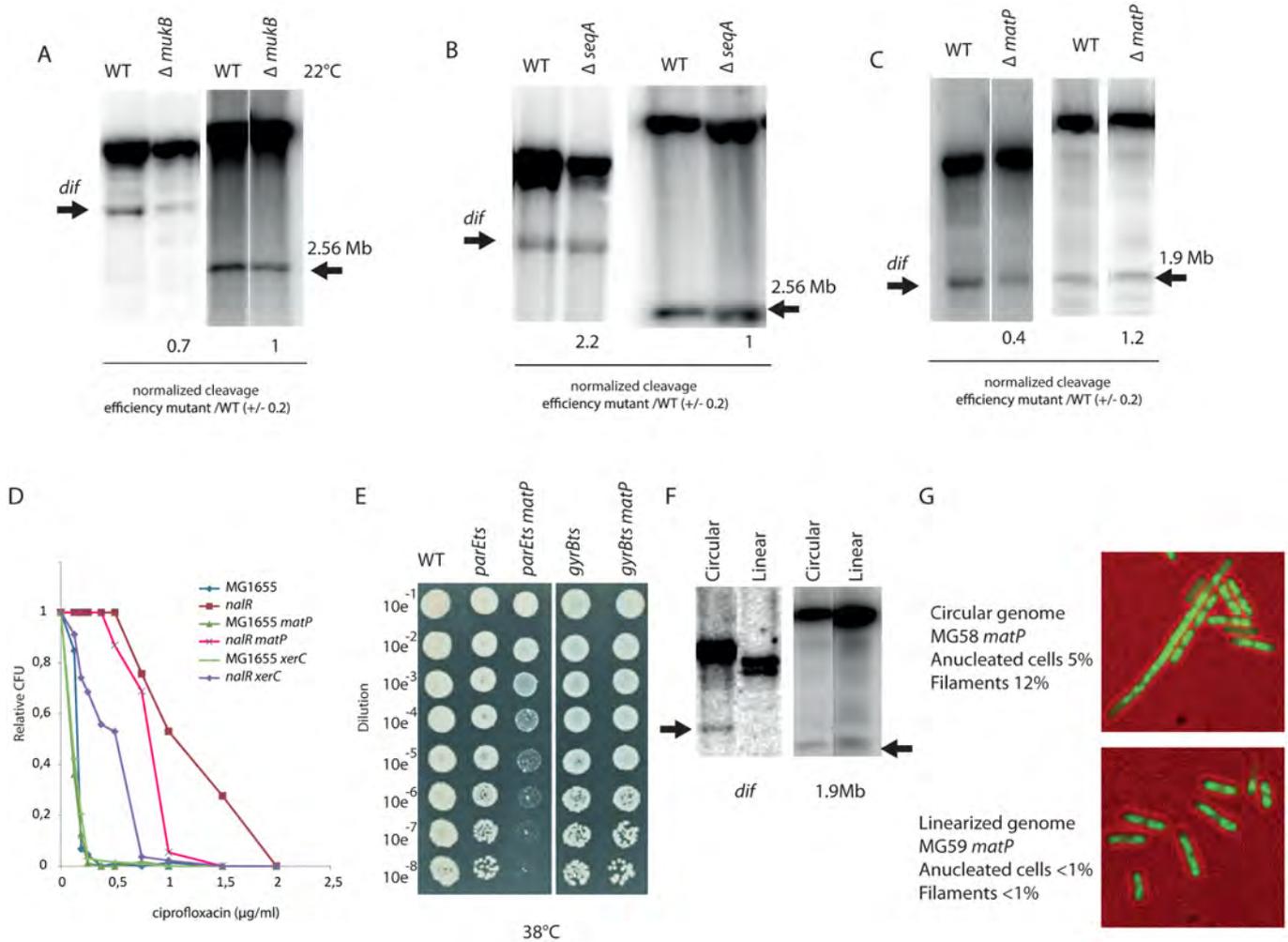


Fig 5. Role of the *dif* site for the management of circular chromosomes. A) Southern blot analysis of Topo IV cleavage at the *dif* and 2.56 Mb sites in the *mukB* mutant grown in minimal medium at 22°C. B) Southern blot analysis of Topo IV cleavage at the *dif* and 2.56 Mb sites in the *seqA* mutant grown in minimal medium at 37°C. C) Southern blot analysis of Topo IV cleavage at the *dif* and 1.9 Mb sites in the *matP* mutant grown in LB at 37°C. D) Colony Forming Unit (CFU) analysis of the WT and *nalR* strains deleted for the *dif* site, the *xerC* and *matP* genes in the presence of ciprofloxacin. E) Colony Forming Unit (CFU) analysis of the WT, *parEts* and *gyrBts* strains deleted for the *matP* at a semi permissive temperature (38°C). F) Southern blot analysis of the Topo IV cleavage at the *dif* and 1.9Mb sites in cells with a circular or linearized chromosome. G) Phenotypes observed during exponential growth in LB in the *matP* mutant strains with circular or linear chromosome (DNA is labeled with DAPI, green). Scale bar is 5µm.

doi:10.1371/journal.pgen.1006025.g005

intracellular positioning of the *ter* region as well as for its progressive segregation pattern ending at *dif* [25, 26]. The Topo IV cleavage at *dif* was significantly impaired in the *matP* mutant (Fig 5C). The Topo IV cleavage site at position 1.9Mb is included in the Ter macrodomain, but cleavage at this site was almost unchanged in the absence of MatP (Fig 5C). Introduction of a *matP* deletion into the *nalR* strain yielded an increase in ciprofloxacin sensitivity (Fig 5D). We also constructed a *parEts matP* double mutant. Growth of this strain was significantly altered compared to the *parEts* parental strain at an intermediate temperature (Fig 5E). Such a synergistic effect was not found when combining the *matP* deletion with a *gyrBts* mutation. Taken together, these results led us to consider that MatP itself or the folding of the Ter macrodomain might be important for Topo IV targeting at *dif*.

Since the FtsK/Xer/*dif* system is dedicated to post-replicative events that are specific to a circular chromosome, it was tempting to postulate that the activity of Topo IV at *dif* is also dedicated to post-replicative decatenation events and is strictly required for circular chromosomes. To address this question, we used *E. coli* strains harboring linear chromosomes [34]. In this strain, expression of TelN from the N15 phage promotes linearization of the chromosome at the *tos* site inserted a 6kb away from *dif*. Indeed, chromosome linearization suppresses the phenotypes associated with *dif* deletion [34]. We analyzed cleavage at the *dif* site by Topo IV in the context of a linearized chromosome. Cleavage was completely abolished; showing that Topo IV activity at *dif* is not required on linear chromosomes. This effect was specific to the *dif* site, since cleavage at the 1.9Mb site remained unchanged after chromosome linearization (Fig 5F). We next assayed if the phenotypes associated with *matP* deletion, i.e., formation of elongated cells with non-partitioned nucleoids [26], depend on chromosome circularity. Strikingly, most of the phenotypes observed in the *matP* mutant were suppressed by linearization of the chromosome (Fig 5G). Interestingly, the frequency of cleavage at *dif* sites inserted far (300 kb) from the normal position of *dif* or in a plasmid were significantly reduced compared to the WT situation (S11 Fig) confirming that Topo IV cleavage at *dif* is specific to circular chromosomes.

Discussion

Specific Topo IV binding and cleavage sites on the chromosome

Whole genome analysis of Topo IV binding by ChIP-seq revealed approximately 10 Topo IV binding sites across the *E. coli* genome. Among them, only 5 sites were strongly enriched in every experiment and these were mapped to positions 1.25, 1.58 (*dif*), 1.85, 2.56 and 3.24 Mb. We did not identify any consensus sequence that could explain specific binding to these sites. Band shift experiments at the *dif* site and the 1.25 Mb site revealed that Topo IV binding is not sequence-dependent.

This led us to favor models involving exogenous local determinants for Topo IV binding as it is the case for the *dif* site in the presence of XerC. Because XerC is only known to bind to *dif*, we could speculate that other chromatin factors might be involved in Topo IV targeting. Topo IV and Fis binding sites [33] overlap more frequently than expected (Nust P value 10e-03 [32]). Topo IV and Fis binding sites overlap at the positions 1.25 and 2.56 Mb; it is therefore possible that Fis plays a role in defining some Topo IV binding sites. However our EMSA, cleavage and ChIP experiments did not show any cooperative binding of Topo IV with Fis. In spite of its colocalization with Topo IV, Fis does not contribute in defining Topo IV binding or cleavage sites. Nevertheless, the role of the chromatin in Topo IV localization was also illustrated by the strong negative correlation observed for the Topo IV and H-NS bound regions. H-NS rich regions were significantly less enriched for nonspecific Topo IV binding than the rest of the chromosome.

Topo IV mediated DNA cleavage sites

We postulated that loci where Topo IV is catalytically-active could be identified by DNA cleavage mediated by the quinolone drug norfloxacin. We designed a new ChIP-seq strategy that consisted of capturing DNA-norfloxacin-Topo IV complexes. We called it NorfIIP. Three independent experiments show that Topo IV was trapped to a large number of loci (300 to 600) with most of these loci observed in two out of three experiments. A hundred of these loci were identified in all three experiments. *Dif* presented a strong signal in the NorfIIP as in the ChIP-seq but this is not the case for most of the other ChIP-seq peaks. NorfIIP peaks presented a characteristic pattern suggesting that they are genuine DNA-norfloxacin-Topo IV complexes. Considering that norfloxacin does not alter Topo IV specificity, our results suggest that for Topo IV the genome is divided into five categories: i) Loci where Topo IV binds strongly but remains inactive

for most of the cell cycle; ii) Loci where Topo IV is highly active but does not reside for very long time; iii) Loci where we observed both binding and activity (*dif* and 2.56 Mb); iv) regions where Topo IV interacts non-specifically with the DNA and where topological activity is not stimulated; v) regions where non-specific interactions are restricted (the Ter domain, chromatin rich regions (tsEPODs [35], H-NS rich regions). Detection of norfloxacin-mediated genomic cleavage by pulse field electrophoresis has previously revealed that when Topo IV is the only target of norfloxacin the average fragment size is 300–400 kb while it drops to 20 kb when Gyrase is the target [11]. This suggests that, for each cell, no more than 10 to 20 Topo IV cleavages are formed in 10 min of norfloxacin treatment. To fit this observation with our data, only a small fraction (10–20 out of 600) of the detected Topo IV cleavage sites would actually be used in each cell. This might explain why Topo IV cleavage sites were hardly distinguishable from background in the ChIP-seq assay (Fig 3). This is in good agreement with the estimation that the catalytic cycle only provokes a short pause (1.8 sec) in Topo IV dynamics [36]. The mechanism responsible for the choice of specific Topo IV cleavage sites is yet to be determined. As indicated by our findings that deletion of the cleavage site resulted in the formation of a new site or sites in the vicinity, cleavage is not directly sequence-related. We observed several biases that might be involved in determination of cleavage sites (GC di-nucleotide skew, GATC spacing, positioning near gene ends or intergenic regions, proximity with highly expressed genes and Fis binding regions). Interestingly inhibition of transcription with rifampicin inhibits Topo IV cleavage (Fig 3). This raises the possibility that transcription, that can be stochastic, may influence stochastic determination of Topo IV activity sites. The influence of transcription could be direct, if RNA polymerase pushes Topo IV to a suitable place, or indirect if the diffusion of topological constraints results in their accumulation near barriers imposed by gene expression [37, 38]. This accumulation could then, in turn, signal for the recruitment of Topo IV.

Replication influences Topo IV binding and activity

Synchronization experiments revealed that, like Topo IV binding at specific sites, Topo IV cleavage activity is enhanced by chromosome replication. Enrichment was the highest in late S phase or G2 phase; it seems to persist after the passage of the replication fork at a defined locus. Enrichment in asynchronous cultures was significantly reduced compared to S40 or G2 synchronized cultures suggesting that Topo IV is not bound to the chromosome for the entire cell cycle. Unfortunately our experiments did not have the time resolution to determine at what point of the cell cycle Topo IV leaves the chromosome and if it would leave the chromosome during a regular cell cycle. The role of DNA replication of Topo IV dynamics has recently been observed by a very different approach [36]. The authors propose that Topo IV accumulates in the *oriC* proximal part of the chromosome in a MukB and DNA replication dependent process. These observations are in good agreement with our data and suggest that Topo IV is loaded on DNA at the time of replication, accumulate towards the origin of replication and remains bound to the DNA until a yet unidentified event triggers its release. Formation of positive supercoils and precatenanes ahead and behind of the replication forks respectively, could be the reason for Topo IV recruitment. One could hypothesize that MukB is used as a DNA topology sensor that is responsible for redistribution of Topo IV. However we only detected a modest effect of *mukB* deletion on Topo IV cleavage at *dif* (Fig 5). Putative events responsible for Topo IV release could be, among others, complete decatenation of the chromosome, SNAPs release, or stripping by other proteins such as FtsK.

Non-specific Topo IV binding

Non-specific Topo IV binding presents a very peculiar pattern; it is significantly higher in the *oriC* proximal 3Mb than in the 1.6Mb surrounding *dif*. This pattern is not simply explained by

the influence of replication (S3 Fig). Interestingly, ChIP-seq and ChIP-on-Chip experiments have already revealed a similar bias for DNA gyrase [12] and SeqA [39]. The CbpA protein has been shown to present an inverse binding bias [40], with enrichment in the terminal region and a reduction in the *oriC* proximal domain. The HU regulon has also presented a similar bias [41]. The terminus domain defined by these biases always comprises the Ter macrodomain but it extends frequently beyond the extreme *matS* sites. The role of MatP in the definition of these biases has not yet been tested. The group of G. Mushelishvili proposed a topological model to interpret the DNA gyrase and HU regulon biases, suggesting that HU coordinates the global genomic supercoiling by regulating the spatial distribution of RNA polymerase in the nucleoid [41]. Topo IV could benefit from such a supercoiling gradient to load on the chromosome. Interestingly, the strongest Topo IV binding and cleavage sites are localized inside the Terminus depleted domain. One possibility could be that these sites minimize Topo IV binding to adjacent nonspecific sequences. Alternatively one can propose that a regional reduction of non-specific binding creates a selective advantage for optimal loading on to specific sites.

Dif and the control of decatenation

Dif was the strongest Topo IV cleavage site detected by NorfIIP, it was also detected in the ChIP-seq assays. We have used Southern blot to analyze the determinants involved in this activity. The binding of XerC on the *xerC* box of *dif* and the region downstream of the *xerC* box are essential. *In vitro*, XerC also strongly favors binding of Topo IV at *dif*. Interestingly XerD and the *xerD* box did not improve Topo IV binding or cleavage. We propose that XerC works as a scaffold for Topo IV, simultaneously stimulating its binding and its activity. Topo IV activity at *dif* is also dependent on the circularity of the chromosome, suggesting that when topological constraints can be evacuated through chromosome ends, Topoisomerase IV does not catalyze strand passage at *dif*. This suggests that topological complexity is directly responsible for Topo IV activity. Topo IV cleavage activity at *dif* is not influenced by SeqA or FtsK, which are two known Topo IV partners. Interestingly, *mukB* and *matP* deletion mutants slightly reduced this activity. The synergistic effect observed when a *matP* deletion is combined with a *parEts* mutation suggests that MatP indeed influences Topo IV activity. The phenotypes of the *matP* mutant are rescued by the linearization of the chromosome. A similar rescue has been observed for the *dif* mutant [34]. Therefore it is likely that a significant part of the problems that cells encounter in the absence of *matP* corresponds to failure in chromosome topology management, either decatenation or chromosome dimer resolution [25]. In conclusion, we propose that genomic regulation of Topo IV consists of: (1) Topo IV loading during replication, (2) Topo IV binding to specific sites that may serve as reservoirs, (3) Topo IV activation to remove precatenanes or positive supercoils in a dozen of stochastically chosen loci (4) XerC and MatP ensuring the loading of Topo IV at the *dif* site for faithful decatenation of fully replicated chromosomes.

Materials and Methods

ChIP-seq assay

ParE-flag and ParC-flag C-terminus fusions were constructed by lambda red recombination [42]. Cultures were grown in LB or Minimal medium A supplemented with succinate (0.2%) and casamino acids (0.2%). Cells were fixed with fresh Formaldehyde (final concentration 1%) at an OD_{600nm} 0.2–0.4. Sonication was performed with a Bioruptor Pro (Diagenode). Immunoprecipitations were performed as previously described²⁶. Libraries were prepared according to Illumina's instructions accompanying the DNA Sample Kit (FC-104-5001). Briefly, DNA was

end-repaired using a combination of T4 DNA polymerase, *E. coli* DNA Pol I large fragment (Klenow polymerase) and T4 polynucleotide kinase. The blunt, phosphorylated ends were treated with Klenow fragment (3' to 5' exo minus) and dATP to yield a protruding 3- 'A' base for ligation of Illumina's adapters which have a single 'T' base overhang at the 3' end. After adapter ligation DNA was PCR amplified with Illumina primers for 15 cycles and library fragments of ~250 bp (insert plus adaptor and PCR primer sequences) were band isolated from an agarose gel. The purified DNA was captured on an Illumina flow cell for cluster generation. Libraries were sequenced on the Genome Analyzer following the manufacturer's protocols.

Norflip assay

Norfloxacin (final concentration 2 μ M) was added to the cultures at OD_{600nm} 0.2 LB for 10 min before harvesting. Sonication and immunoprecipitation were performed as described for the ChIP-seq assay.

Analysis of sequencing results

Sequencing results were processed by the IMAGIF facility. Base calls were performed using CASAVA version 1.8.2. ChIP-seq and NorfIIP reads were aligned to the *E. coli* NC_000913 genome using BWA 0.6.2. A custom made pipeline for the analysis of sequencing data was developed with Matlab (available on request). Briefly, the number of reads for the input and IP data was smoothed over a 200bp window. Forward and reverse signals were added, reads were normalized to the total number of reads in each experiment, strong non-specific signals observed in unrelated experiments were removed, data were exported to the UCSC genome browser for visualization and comparisons. The strongest peaks observed with NorfIIP experiments (*dif* and 1.9 Mb) present a characteristic shape (S6 Fig) that allows the automatic detection of lower amplitude peaks but preserves the characteristic shape. We measured Pearson correlation coefficient with the *dif* and the 1.9 Mb site for 600bp sliding windows over the entire genome. Peaks with a Pearson correlation above 0.72 were considered as putative Topo IV cleavage sites. Sequencing data are available on the GEO Repository (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) with the accession number GSE75641. Data were plotted with the Circos tool [43] and UCSC Archaeal Genome Browser [44].

Southern blot

Cleavage of DNA by Topo IV in the presence of Norfloxacin was monitored by Southern blot as previously described [10]. DNA was extracted from *E. coli* culture grown in minimal medium supplemented with glucose 0.2% and casaminoacids 0.2%. Norfloxacin (final concentration 10 μ M) was added to the cultures at OD 0.2 for 10 min before harvesting. DNA was transferred by neutral blotting on nitrocellulose membranes. For synchronization experiments a flash freeze step in liquid nitrogen is included before harvesting. Quantification was performed with Image J software.

EMSA

Experiments were conducted using Cy3-coupled probes harboring the *dif* site and a Cy5-coupled dye as control. Reactions were carried out in EMSA reaction buffer (1mM spermidine, 30mM potassium glutamate, 10mM DTT, 6mM magnesium chloride, 10% glycerol, pH 7.4). Reactions were incubated for 15 min at RT, loaded on 4% native PAGE gel at 25 volts and then run at 125 volts for 2 hours. Gels were then visualized using a Typhoon FLA 5000 scanner (GE healthcare Life Science). EMSA of plasmids were performed with unlabeled supercoiled

plasmid in the same reaction buffer. Electrophoresis was performed in a 0.8% agarose gel in 0.5x TAE buffer at 4°C for 80 min at 150V. DNA labeling was performed with SYBR green.

Supporting Information

S1 Fig. A) Measure of the colony formation unit (CFU) of the WT, *nalR*, ParC-Flag, ParC-Flag *nalR* and ParE-Flag *nalR* strains. Culture were grown until OD 0.2 and treated for 40 minutes with norfloxacin 2μM and plated on LB plates. **B)** Measure of the growth rate of the *nalR*, ParC-Flag *nalR* and ParE-Flag *nalR* strains. **C)** Southern blot analysis of Topo IV mediated cleavage in the presence of norfloxacin at the 1.9 Mb site in the WT, *nalR* and ParC-Flag *nalR* and ParE-Flag *nalR* strains.
(PDF)

S2 Fig. Genome browser magnifications illustrating common non-specific signal observed over rRNA operons, tRNA and IS sequences. ParE-Flag ChIP-seq is represented in red, MatP-Flag ChIP-seq is represented in blue, Mock IP with a strain that did not contain Flag tagged proteins is represented in black. Genes, ribosomal operons and tRNA are represented below ChIPseq signals
(PDF)

S3 Fig. A) Analysis of the Topo IV nonspecific binding. Normalized enrichment (Average number of reads in a 1kb sliding window divided by the total amount of reads) of each flag immuno-precipitation experiment was plotted as a function of the genomic position. Left panel a 100 kb region near *oriC* (positions 4.26 to 4.36 Mb) is represented. Right panel a 100 kb region around *dif* (positions 1.55 to 1.65 Mb) is represented. **B)** Scatter plot of the average GC content according to *parC-flag* IP/Input. 60 kb sliding windows were used for GC content and IP/Input. **C)** Average IP/Input values were normalized for GC content. **D)** Null model I, a Topo IV comet follows replication forks. Illustration of the Topo IV binding kinetics under null model I described in [S1 Text](#). The x axis in the plots represents the chromosome coordinate s, going between 0 (*ori*) and L (*ter*). The y axis represents cell cycle time. The shaded areas are the positions of the Topo IV comets (also sketched as red lines on a circular representation of the chromosome), and the numbers represent the number of bound regions per replichore. **Left panel:** case of non-overlapping rounds. **Right panel:** case of overlapping rounds, in the case where the B period starts after the termination of replication within the same cell cycle. **E)** Topo IV binding bias, shown by the specific Input/IP values (each normalized by total reads). This bias is not compatible with a model where Topo IV binding follows replication and persists for a characteristic period of time (purple trace).
(PDF)

S4 Fig. Flow cytometry analysis of the synchronization experiment. Samples were fixed in ethanol at different time points: after 1h30 at 40°C (G1), 20 min after downshift to 30°C (S20), 40 min after downshift to 30°C (S40), 60 min after downshift to 30°C (G2) and in stationary phase.
(PDF)

S5 Fig. A) Genome browser magnifications illustrating common non specific signal observed over rRNA operon, IS sequences in the NorflIP and ChIP-seq experiments. ParE-Flag NorflIP is represented in purple, MatP-Flag ChIP-seq is represented in blue, Mock IP with a strain that did not contained Flag tagged proteins is represented in black. Genomic localization are the same as in [S2 Fig B\)](#) Southern blot cleavage assays performed in WT and *nalR* strains at the *insH* locus, ribosomal operon A and ribosomal operon B. TopoIV did not present any cleavage

in this regions confirming the artefactual nature of the corresponding signals in the NorflIP experiments. Arrows indicated the position on the corresponding bottom map.
(PDF)

S6 Fig. **A)** Snapshots of the ChIP-seq and NorflIP experiments at the position 1.85 and 1.92 Mb. Topo IV binding to position 1.85 Mb was only revealed by the ChIP-seq experiment in the presence of formaldehyde. Topo IV cleavage at position 1.92 Mb was only revealed by the NorflIP experiment. NorflIP peaks present a characteristic shape illustrated on the 1.92Mb with a large 200 bp empty region in between the forward and reverse signal (arrow). **B)** Snapshot of the ChIP-seq and NorflIP experiments at the *dif* position. Topo IV binding (ChIP-seq) and cleavage (NorflIP) were detected at the *dif* position. **C)** Description of the NorflIP peak calling procedure. Forward and reverse reads from the Flag immunoprecipitation were smoothed over 200 bp, and then subtracted from each other. The *dif* and 1.9Mb signals observed on a 2kb window were used as a probe to test the entire genome with 100 bp sliding intervals. Pearson coefficient between the *dif* and 1.9 Mb signals and each interval were measured. Pearson coefficients above 0.72 were considered as putative Topo IV peaks. The initial list of Topo IV sites (S1 Table) corresponds to sites presenting a Pearson correlation above 0.72 in comparison with *dif* and 1.9Mb. IP/input ratio was measured. 172 peaks with Pearson coefficient above 0.72 and an IP/input ratio >2 were manually validated as Topo IV sites (S1 Table). **D)** Analysis of reads orientation in the NorflIP experiment at position 0.2Mb. Forward and reverse read peaks are about 200 bp large, a 100 nucleotides gap is observed in between the peaks. For the analysis of Topo IV cleavage site distribution we estimated that the center of the 100 nucleotides gap corresponds to the position of Topo IV cleavage.
(PDF)

S7 Fig. Measure of the distance between two adjacent Topo IV cleavage sites in the *dif* region **(A)** and the region containing *oriC* and SNAP2 **(B)**. For this analysis the 571 Topo IV cleavage sites observed in the 3 experiments were pooled. **C)** Distribution of the Topo IV cleavages inside genes and intergenic regions. The gene sizes were normalized to 1. **D)** RSAT analysis of the NorflIP peak calling results (<http://www.rsat.eu/>; Thomas-Chollier M, Defrance M, Medina-Rivera A, Sand O, Herrmann C, Thieffry D, van Helden J. (2011) RSAT 2011: regulatory sequence analysis tools. Nucleic Acids Res. 2011 Jul;39. Analysis of the dinucleotide bias in 172 manually validated NorflIP Topo IV cleavage sites. In average GC dinucleotides are enriched near the middle of the ChIP signal. **E)** GATC spacing around Topo IV peaks detected with the NorflIP experiment. Average distances between two consecutive GATC are measured around (+/- 20 GATC sites) 172 validated Topo IV cleavage sites and 172 random sequences.
(PDF)

S8 Fig. **A)** Box plot of the distribution of distance between TopoIV cleavages and the closest highly expressed transcription unit (T.U.). For this analysis the 571 Topo IV cleavage sites observed in the 3 experiments were pooled. T.U. expression was determined by RNAseq. An arbitrary threshold was set to 500 reads, it corresponds to the 10% of the T.U. the most expressed. The distribution of a random set of cleavage sites was used as control. The two distributions are statistically different according to Anova test. The median distance is 8.5 kb for the TopoIV cleavage set and 12.3 kb for the random set. **B)** Genome browser zoom on the region 1.92 Mb where TopoIV cleavages were observed in a region with a number of highly expressed T.U. **C)** Distribution of 458 Topo IV cleavages (black) and random sites (grey) in between two consecutive highly expressed T. U. Topo IV cleavages are slightly more frequent near the TU than in the middle of the region.
(PDF)

S9 Fig. **A)** Distribution of ParE-Flag 1 ChIP-seq enrichment in the region overlapping or not a H-NS binding site. **B)** Box plot of the distribution of GC% in the regions depleted for Topo IV (IP/input <0.6) or enriched for Topo IV (IP/input >1.2) or enriched for H-NS. **C)** Distribution of the GC% in 172 validated Topo IV cleavage sites as function of NorflIP IP/input signal. **D)** Measure of the GC% in the 172 validated cleavage sites. GC % was measured in sliding windows of 20 bp and color coded.
(PDF)

S10 Fig. **A)** Analysis of the robustness of the Topo IV-XerC-*dif* complex in the presence of increasing amounts of XerD protein. EMSA were performed with prebound Topo IV and XerC on *dif* and subsequent addition of XerD for 10 minutes before loading on the gel. **B)** Analysis of Topo IV binding to negatively supercoiled plasmid by EMSA on agarose gel. Topo IV from 10, 50, 100, 200 nM was added to the pFC24 (*dif*) plasmid in the presence of XerCD (25 or 50 nM).
(PDF)

S11 Fig. **A)** Southern Blot analysis of Topo IV cleavage in the *nalR* strain at *dif* and an ectopic *dif* site located at 1.3Mb on the genomic map. **B)** Southern Blot analysis of Topo IV cleavage on a plasmid (pFC25) carrying the *dif* region (10 kb around *dif*) + or-*dif*
(PDF)

S1 Table. Sheet 1) Validated ChIP-seq sites. **Sheet 2)** NorflIP sites observed in the ParC-Flag 1 NorflIP, ParE-Flag NorflIP and ParC-Flag 2 NorflIP. **Sheet 3)** Common NorflIP sites for the different experiments. **Sheet 4)** Manually Validated Topo IV cleavages.
(XLSX)

S1 Text. Model to test the correlation between TopoIV binding and the progression of replication. To test if ParC and ParE ChIP-seq biases were related to chromosome replication we constructed *in silico* models The result of this null model is that in all cases (overlapping or non-overlapping rounds) the observed mean occupancy should follow the dosage. Hence the occupancy gap observed in [S3E Fig](#) in the Ter region (when occupancy is normalized by dosage) has to be interpreted as a sign that this model does not apply, at least in this region.
(DOCX)

Acknowledgments

We thank D. Sherratt, K. Mariani, D. Grainger, J. Berger, P. Rousseau and F.X. Barre for the generous gift of proteins and plasmids. We thank Marie Franquin, Jorgelindo Da Veiga Moreira and Estelle Mignot for preliminary experiments. We thank Stephane Marcand for Southern blot tips. We thank Charlotte Cockram for careful reading of the manuscript. We thank Ivan Junier and Thibault Lepage for technical help with Circos. We thank the IMAGIF genomic facility for deep sequencing.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: HES LLC EL FC OE. Performed the experiments: HES LLC EL EV CP. Analyzed the data: HES LLC EL FC MCL OE. Wrote the paper: FC MCL OE. Conceived and analyzed models: MCL OE.

References

1. Khodursky A. B. et al. Analysis of topoisomerase function in bacterial replication fork movement: use of DNA microarrays. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 9419–9424 (2000). PMID: [10944214](#)

2. Peter B. J., Ullsperger C., Hiasa H., Marians K. J. & Cozzarelli N. R. The structure of supercoiled intermediates in DNA replication. *Cell* 94, 819–827 (1998). PMID: [9753328](#)
3. Martínez-Robles M. L. et al. Interplay of DNA supercoiling and catenation during the segregation of sister duplexes. *Nucleic Acids Res.* 37, 5126–5137 (2009). doi: [10.1093/nar/gkp530](#) PMID: [19553196](#)
4. Wang X., Montero Llopis P. & Rudner D. Z. Organization and segregation of bacterial chromosomes. *Nat. Rev. Genet.* 14, 191–203 (2013). doi: [10.1038/nrg3375](#) PMID: [23400100](#)
5. Zechiedrich E. L., Khodursky A. B. & Cozzarelli N. R. Topoisomerase IV, not gyrase, decatenates products of site-specific recombination in *Escherichia coli*. *Genes Dev.* 11, 2580–2592 (1997). PMID: [9334322](#)
6. Peng H. & Marians K. J. Decatenation activity of topoisomerase IV during oriC and pBR322 DNA replication in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90, 8571–8575 (1993). PMID: [8104339](#)
7. Charvin G., Bensimon D. & Croquette V. Single-molecule study of DNA unlinking by eukaryotic and prokaryotic type-II topoisomerases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 9820–9825 (2003). PMID: [12902541](#)
8. Crisona N. J., Strick T. R., Bensimon D., Croquette V. & Cozzarelli N. R. Preferential relaxation of positively supercoiled DNA by *E. coli* topoisomerase IV in single-molecule and ensemble measurements. *Genes Dev.* 14, 2881–2892 (2000). PMID: [11090135](#)
9. Neuman K. C., Charvin G., Bensimon D. & Croquette V. Mechanisms of chiral discrimination by topoisomerase IV. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 6986–6991 (2009). doi: [10.1073/pnas.0900574106](#) PMID: [19359479](#)
10. Espéli O. & Boccard F. In vivo cleavage of *Escherichia coli* BIME-2 repeats by DNA gyrase: genetic characterization of the target and identification of the cut site. *Mol. Microbiol.* 26, 767–777 (1997). PMID: [9427406](#)
11. Hsu Y.-H., Chung M.-W. & Li T.-K. Distribution of gyrase and topoisomerase IV on bacterial nucleoid: implications for nucleoid organization. *Nucleic Acids Res.* 34, 3128–3138 (2006). PMID: [16757578](#)
12. Jeong K. S., Ahn J. & Khodursky A. B. Spatial patterns of transcriptional activity in the chromosome of *Escherichia coli*. *Genome Biol.* 5, R86 (2004). PMID: [15535862](#)
13. Wang X., Reyes-Lamothe R. & Sherratt D. J. Modulation of *Escherichia coli* sister chromosome cohesion by topoisomerase IV. *Genes Dev.* 22, 2426–2433 (2008). doi: [10.1101/gad.487508](#) PMID: [18765793](#)
14. Kato J. et al. New topoisomerase essential for chromosome segregation in *E. coli*. *Cell* 63, 393–404 (1990). PMID: [2170028](#)
15. Lesterlin C., Gigant E., Boccard F. & Espéli O. Sister chromatid interactions in bacteria revealed by a site-specific recombination assay. *EMBO J.* 31, 3468–3479 (2012). doi: [10.1038/emboj.2012.194](#) PMID: [22820946](#)
16. Joshi M. C. et al. Regulation of sister chromosome cohesion by the replication fork tracking protein SeqA. *PLoS Genet.* 9, e1003673 (2013). doi: [10.1371/journal.pgen.1003673](#) PMID: [23990792](#)
17. Vos S. M., Stewart N. K., Oakley M. G. & Berger J. M. Structural basis for the MukB-topoisomerase IV interaction and its functional implications in vivo. *EMBO J.* 32, 2950–2962 (2013). doi: [10.1038/emboj.2013.218](#) PMID: [24097060](#)
18. Hayama R., Bahng S., Karasu M. E. & Marians K. J. The MukB-ParC interaction affects the intramolecular, not intermolecular, activities of topoisomerase IV. *J. Biol. Chem.* 288, 7653–7661 (2013). doi: [10.1074/jbc.M112.418087](#) PMID: [23349462](#)
19. Li Y. et al. *Escherichia coli* condensin MukB stimulates topoisomerase IV activity by a direct physical interaction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 18832–18837 (2010). doi: [10.1073/pnas.1008678107](#) PMID: [20921377](#)
20. Nicolas E. et al. The SMC complex MukBEF recruits topoisomerase IV to the origin of replication region in live *Escherichia coli*. *mBio* 5, e01001–01013 (2014). doi: [10.1128/mBio.01001-13](#) PMID: [24520061](#)
21. Kang S., Han J. S., Park J. H., Skarstad K. & Hwang D. S. SeqA protein stimulates the relaxing and decatenating activities of topoisomerase IV. *J. Biol. Chem.* 278, 48779–48785 (2003). PMID: [14512422](#)
22. Espeli O., Levine C., Hassing H. & Marians K. J. Temporal regulation of topoisomerase IV activity in *E. coli*. *Mol. Cell* 11, 189–201 (2003). PMID: [12535532](#)
23. Espeli O., Mercier R. & Boccard F. DNA dynamics vary according to macrodomain topography in the *E. coli* chromosome. *Mol. Microbiol.* 68, 1418–1427 (2008). doi: [10.1111/j.1365-2958.2008.06239.x](#) PMID: [18410497](#)
24. Li Y., Youngren B., Sergueev K. & Austin S. Segregation of the *Escherichia coli* chromosome terminus. *Mol. Microbiol.* 50, 825–834 (2003). PMID: [14617144](#)

25. Stouf M., Meile J.-C. & Cornet F. FtsK actively segregates sister chromosomes in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, 11157–11162 (2013). doi: [10.1073/pnas.1304080110](https://doi.org/10.1073/pnas.1304080110) PMID: [23781109](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23781109/)
26. Mercier R. et al. The MatP/matS site-specific system organizes the terminus region of the *E. coli* chromosome into a macrodomain. *Cell* 135, 475–485 (2008). doi: [10.1016/j.cell.2008.08.031](https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.08.031) PMID: [18984159](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18984159/)
27. Bigot S. & Marians K. J. DNA chirality-dependent stimulation of topoisomerase IV activity by the C-terminal AAA+ domain of FtsK. *Nucleic Acids Res.* 38, 3031–3040 (2010). doi: [10.1093/nar/gkp1243](https://doi.org/10.1093/nar/gkp1243) PMID: [20081205](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20081205/)
28. Espeli O., Lee C. & Marians K. J. A physical and functional interaction between *Escherichia coli* FtsK and topoisomerase IV. *J. Biol. Chem.* 278, 44639–44644 (2003). PMID: [12939258](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12939258/)
29. Hojgaard A., Szerlong H., Tabor C. & Kuempel P. Norfloxacin-induced DNA cleavage occurs at the dif resolvase locus in *Escherichia coli* and is the result of interaction with topoisomerase IV. *Mol. Microbiol.* 33, 1027–1036 (1999). PMID: [10476036](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10476036/)
30. Dupaigne P. et al. Molecular basis for a protein-mediated DNA-bridging mechanism that functions in condensation of the *E. coli* chromosome. *Mol. Cell* 48, 560–571 (2012). doi: [10.1016/j.molcel.2012.09.009](https://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.09.009) PMID: [23084832](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23084832/)
31. Morais Cabral J. H. et al. Crystal structure of the breakage-reunion domain of DNA gyrase. *Nature* 388, 903–906 (1997). PMID: [9278055](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9278055/)
32. Scolari V. F., Zarei M., Osella M. & Lagomarsino M. C. NuST: analysis of the interplay between nucleoid organization and gene expression. *Bioinforma. Oxf. Engl.* 28, 1643–1644 (2012).
33. Kahramanoglou C. et al. Direct and indirect effects of H-NS and Fis on global gene expression control in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res.* 39, 2073–2091 (2011). doi: [10.1093/nar/gkq934](https://doi.org/10.1093/nar/gkq934) PMID: [21097887](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21097887/)
34. Cui T. et al. *Escherichia coli* with a linear genome. *EMBO Rep.* 8, 181–187 (2007). PMID: [17218953](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17218953/)
35. Vora T., Hottes A. K. & Tavazoie S. Protein occupancy landscape of a bacterial genome. *Mol. Cell* 35, 247–253 (2009). doi: [10.1016/j.molcel.2009.06.035](https://doi.org/10.1016/j.molcel.2009.06.035) PMID: [19647521](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19647521/)
36. Zawadzki P. et al. The Localization and Action of Topoisomerase IV in *Escherichia coli* Chromosome Segregation Is Coordinated by the SMC Complex, MukBEF. *Cell Rep.* 13, 2587–2596 (2015). doi: [10.1016/j.celrep.2015.11.034](https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.11.034) PMID: [26686641](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26686641/)
37. Deng S., Stein R. A. & Higgins N. P. Organization of supercoil domains and their reorganization by transcription. *Mol. Microbiol.* 57, 1511–1521 (2005). PMID: [16135220](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16135220/)
38. Le T. B. K., Imakaev M. V., Mirny L. A. & Laub M. T. High-resolution mapping of the spatial organization of a bacterial chromosome. *Science* 342, 731–734 (2013). doi: [10.1126/science.1242059](https://doi.org/10.1126/science.1242059) PMID: [24158908](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24158908/)
39. Waldminghaus T., Weigel C. & Skarstad K. Replication fork movement and methylation govern SeqA binding to the *Escherichia coli* chromosome. *Nucleic Acids Res.* 40, 5465–5476 (2012). doi: [10.1093/nar/gks187](https://doi.org/10.1093/nar/gks187) PMID: [22373925](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22373925/)
40. Chintakayala K. et al. *E. coli* Fis protein insulates the *cbpA* gene from uncontrolled transcription. *PLoS Genet.* 9, e1003152 (2013). doi: [10.1371/journal.pgen.1003152](https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003152) PMID: [23341772](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23341772/)
41. Berger M. et al. Coordination of genomic structure and transcription by the main bacterial nucleoid-associated protein HU. *EMBO Rep.* 11, 59–64 (2010). doi: [10.1038/embor.2009.232](https://doi.org/10.1038/embor.2009.232) PMID: [20010798](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20010798/)
42. Datsenko K. A. & Wanner B. L. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 6640–6645 (2000). PMID: [10829079](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10829079/)
43. Krzywinski M. et al. Circos: An information aesthetic for comparative genomics. *Genome Res.* 19, 1639–1645 (2009). doi: [10.1101/gr.092759.109](https://doi.org/10.1101/gr.092759.109) PMID: [19541911](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19541911/)
44. Chan P. P., Holmes A. D., Smith A. M., Tran D. & Lowe T. M. The UCSC Archaeal Genome Browser: 2012 update. *Nucleic Acids Res.* 40, D646–652 (2012). doi: [10.1093/nar/gkr990](https://doi.org/10.1093/nar/gkr990) PMID: [22080555](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22080555/)

Author : Elise Lebailly

Title: Study of the role of the *ter* region in chromosome positioning, chromosome segregation and control of cell division in *Escherichia coli*

Supervisor : Dr. François CORNET

Escherichia coli, as the majority of bacteria, has a unique circular chromosome. Faithful cell proliferation requires that at least one copy of the chromosome is transmitted to sister cells prior to cell division. A strict temporal and spatial coupling of chromosome segregation with cell division is thus required to ensure the accurate separation of the two fully replicated chromosomes. The terminal region of the chromosome (*ter*) is the last one to be replicated and segregated, and moves from the pole to the middle of the cell where the division septum is formed, at the end of the cell cycle. Loci of the *ter* region display an extended cohesion period. This extended cohesion is controlled by the MatP protein, which binds specific *matS* sites restricted to the *ter* region. MatP binds DNA as a dimer and forms tetramers via its N-terminal and C-terminal domains respectively. Tetramerisation is stimulated by binding to DNA and pairs remote *matS* sites. MatP also interacts with ZapB, a component of the divisome, the protein machinery that contributes to septum formation. While tetramerisation of MatP appears important for compacting the *ter* region, its interaction with ZapB, which is localized at the septum via ZapA and FtsZ, is involved in the positioning and the extended cohesion of this region. The linkage of the *ter* region with the divisome is required for the success of many later events of the cell cycle : (i) the active, ordered and progressive segregation of the *ter* region by FtsK, a component of the divisome, (ii) resolution of chromosome dimers via the site-specific recombination XerCD/*dif*, activated by FtsK, (iii) the resolution of intercatenation links by TopoIV and (iv) the positive regulation of divisome assembly in the absence of the negative regulators MinCDE and SlmA.

During my thesis, I first studied the role of MatP in the chromosome management. By using pairs of loci tagged with *parSp1* and *parSpMT1* sites recognized by cognate ParB-XFP proteins, we directly analysed chromosome positioning and orientation in the cell. We show that MatP is required for normal positioning and orientation of the whole chromosome at the end of the cell cycle. The localisation of SlmA in *wt* and Δ *matP* strains proves that inactivation of MatP leads to inaccuracy of nucleoid positioning accompanied by defects in SlmA localisation, and thus induces division inhibition. Take together, these results show that MatP, SlmA and their interplay are important for chromosome management and control of cell division in *E. coli*. In collaboration with O. Espeli's team, we have used genomic and molecular biology methods to characterize TopoIV regulation during the *E. coli* cell cycle. We show that at the *dif* site, TopoIV binding and cleavage are enhanced by the presence of the XerCD recombinases and MatP. This enhancement of TopoIV activity at *dif* promotes decatenation of fully replicated chromosomes and ensure, through interaction with other processes, accurate separation of sister chromosomes. These results provide insight into the protein network dedicated to the final step of chromosome management during the cell cycle, and how the chromosome management is linked to cell division.

Keywords : chromosome segregation; cell division ; *Escherichia coli* ; *ter* region ; MatP ; SlmA ; TopoIV

Auteur : Elise Lebailly

Titre : Etude du rôle de la région terminale du chromosome dans le positionnement, la ségrégation du chromosome et le contrôle de la division cellulaire chez *Escherichia coli*

Directeur de Thèse : Dr. François CORNET

Lieu et date de soutenance : Vendredi 30 Septembre 2016, Salle de conférence de l'IBCG, UPS, Toulouse

Escherichia coli, comme la majorité des bactéries, possède un unique chromosome circulaire. Au moins une copie du chromosome doit être transmise à chacune des cellules filles avant la division cellulaire afin d'assurer une prolifération cellulaire correcte. Un couplage spatio-temporel précis de la ségrégation avec la division cellulaire est donc nécessaire pour assurer la bonne répartition des deux chromosomes après répllication. La région terminale du chromosome (*ter*) est la dernière à être répliquée et ségréguée, et migre du pôle vers le centre de la cellule au moment de la mise en place du septum de division, à la fin du cycle cellulaire. Les loci de la région *ter* présentent une période de cohésion post-répllicative étendue. Cette cohésion étendue est contrôlée par la protéine MatP, qui se fixe spécifiquement au niveau des sites *matsS*, présents uniquement dans *ter*. MatP se fixe à l'ADN sous forme de dimère, via son domaine N-terminal, et tétramérise via son domaine C-terminal. La tétramérisation est stimulée par la liaison à l'ADN et permet le pontage de deux sites *matsS* distants. MatP interagit aussi avec ZapB, un composant du divisome, la machinerie protéique participant à la formation du septum. Alors que la tétramérisation de MatP semble importante pour la compaction de la région *ter*, son interaction avec ZapB, qui est localisée au septum via ZapA et FtsZ, participe au positionnement et à la cohésion étendue de cette région. Le couplage de la région *ter* avec le divisome est essentiel pour le bon déroulement de nombreux événements tardifs du cycle cellulaire : (i) la ségrégation active, ordonnée et progressive de la région *ter* par FtsK, un composant du divisome, (ii) la résolution des dimères de chromosomes via la recombinaison spécifique de site XerCD/*dif*, activée par FtsK, (iii) la résolution des liens d'intercaténation par la TopoIV et (iv) la régulation positive de l'assemblage du divisome en absence des régulateurs négatifs MinCDE et SlmA.

Pendant ma thèse, je me suis tout d'abord intéressée au rôle de MatP dans la structuration globale du chromosome. En utilisant un système permettant de visualiser deux loci marqués avec un site *parSp1* et un site *parSpMT1*, reconnu ParBp1-XFP et ParBpMT1 spécifiquement, nous avons analysé le positionnement et l'orientation du chromosome dans la cellule. Nous avons montré que MatP est nécessaire au positionnement et à l'orientation de tout le chromosome à la fin du cycle cellulaire. La localisation de SlmA dans des souches *wt* et Δ *matP* prouve que l'inactivation de MatP, induisant un mauvais positionnement du chromosome, s'accompagne d'un défaut de localisation de SlmA, et induit donc une inhibition de la division. Ces résultats pris ensemble montre que MatP, SlmA et leur communication à travers la structuration globale du chromosome sont importants pour le management du chromosome et le contrôle de la division cellulaire. En collaboration avec l'équipe d'Olivier Espeli, nous avons utilisé des méthodes de génomiques et de biologie moléculaire pour caractériser la régulation de la TopoIV au cours du cycle cellulaire d'*E. coli*. Nous avons montré qu'au site *dif*, les activités de fixation et de clivage de la TopoIV sont améliorées par la présence des recombinases XerCD et de MatP. L'amélioration de l'activité de la TopoIV favorise la décaténation des chromosomes nouvellement répliqués et assure, en lien avec d'autres processus, la séparation précise des chromosomes frères. Ces résultats permettent de mieux comprendre le réseau d'interactions dédiées au management du chromosome à la fin du cycle cellulaire, et l'influence du management du chromosome sur le contrôle de la division cellulaire.

Mots-clefs : Ségrégation des chromosomes ; Division cellulaire ; *Escherichia coli* ; Région *ter* ; MatP ; SlmA ; TopoIV

Discipline administrative : Microbiologie

Laboratoire : LMGM, Batiment IBCG, Université Paul Sabatier, 118 Route de Narbonne, 31062 Toulouse Cedex 9