



HAL
open science

Dynamique du chromosome bactérien et expression génique chez la bactérie phytopathogène *Dickeya dadantii*

Diana Le Berre

► **To cite this version:**

Diana Le Berre. Dynamique du chromosome bactérien et expression génique chez la bactérie phytopathogène *Dickeya dadantii*. Génétique. Université de Lyon, 2022. Français. NNT : 2022LYSE1152 . tel-04233918

HAL Id: tel-04233918

<https://theses.hal.science/tel-04233918v1>

Submitted on 9 Oct 2023

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.



N°d'ordre NNT : 2022LYSE1152

THESE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON
opérée au sein de
l'Université Claude Bernard Lyon 1

Ecole Doctorale N° 341
Evolution, Ecosystèmes, Microbiologie, Modélisation

Spécialité de doctorat : Microbiologie, Génétique

Soutenue publiquement le 26/07/2022, par :
Diana Zary LE BERRE

**Dynamique du chromosome bactérien
et expression génique chez la bactérie
phytopathogène *Dickeya dadantii***

Devant le jury composé de :

BARNY, Marie-Anne, Directrice de recherche INRA, Paris Sorbonne	Rapporteuse
SCLAVI Bianca, Directrice de recherche CNRS, Paris Sorbonne	Rapporteuse
SOBETZKO Patrick, Group Leader, Marburg	Rapporteur
HOMMAIS Florence, Maître de conférences, Lyon	Examinatrice
PRIGENT-COMBARET Claire, Directrice de recherche CNRS, Lyon	Présidente
NASSER Henri William, Directeur de recherche CNRS, Lyon	Directeur de thèse

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

Président de l'Université

Président du Conseil Académique

Vice-président du Conseil d'Administration

Vice-président du Conseil Formation et Vie
Universitaire

Vice-président de la Commission Recherche
Directeur Général des Services

M. le Professeur Frédéric FLEURY

M. le Professeur Hamda BEN HADID

M. le Professeur Didier REVEL

M. le Professeur Philippe CHEVALIER

M. le Professeur Petru MIRONESCU
M. Pierre ROLLAND

COMPOSANTES SANTE

Faculté de Médecine Lyon Est – Claude Bernard

Faculté de Médecine et de Maïeutique Lyon
Sud Charles Mérieux

Faculté d'Odontologie

Institut des Sciences Pharmaceutiques
et Biologiques

Institut des Sciences et Techniques de la
Réadaptation

Département de formation et Centre de
Recherche en Biologie Humaine

Directeur : M. le Professeur G.RODE

Directrice : Mme la Professeure C.BURILLON

Directeur : M. le Professeur J.C.MAURIN

Directeur : M. C.DUSSART

Directeur : M. le Professeur J.LUAUTE

Directrice : Mme L.BIGNON

COMPOSANTES ET DEPARTEMENTS DE SCIENCES ET TECHNOLOGIE

Facultés des sciences et technologie
Département Biologie

Département Chimie Biochimie

Département GEP

Département Informatique

Département Mathématiques

Département Mécanique

Département Physique

Directeur : M. le Professeur B. ANDRIOLETTI

Directrice : Mme la Professeure K.GIESELER

Directrice : Mme C.FELIX

Directrice : Mme la Professeure R.FERRIGNO

Directeur : M. le Professeur B.SHARIAT

Directeur : M. le Professeur F.LAGOUTIERE

Directeur : M. le Professeur M.BUFFAT

Directeur : M. le Professeur J.C.PLENET

UFR Sciences et Techniques des Activités
Physiques et Sportives

Observatoire des Sciences de l'Univers de Lyon

Directeur : M. le professeur G.BODET

Directrice : Mme la professeure I.DANIEL

Polytech Lyon

Ecole Supérieure de Chimie Physique

Electronique

Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1

Ecole Supérieure du Professorat et de

l'Education

Institut de Science Financière et d'Assurances

Directeur : M. le Professeur E.PERRIN

Directeur : M. G.PIGNAULT

Directeur : M. le Professeur M.MASSENZIO

Directeur : M. P.CHAREYRON

Directeur : M. N.LEBOISNE

Résumé

Les bactéries sont confrontées à des environnements fluctuants et doivent adapter leur état physiologique pour survivre à ces changements. Cette acclimatation passe par une reprogrammation génétique. Chez les bactéries, la topologie de l'ADN est très sensible aux conditions environnementales et les changements du niveau d'enroulement de l'ADN modulent la distribution des facteurs de transcription et de l'ARN polymérase dans le génome. Le niveau d'enroulement global de l'ADN est contrôlé par les ADN topoisomérases alors que les protéines associées au nucléoïde (NAPs) modulent l'architecture locale du nucléoïde et agissent comme des régulateurs globaux. Par ailleurs, des travaux réalisés sur l'activité de l'ARN polymérase durant la croissance chez la bactérie *Escherichia coli* suggèrent que lorsqu'une région du chromosome est fortement transcrite, elle est exposée à la surface du nucléoïde alors que les régions faiblement transcrites se retrouvent enfouies au cœur du nucléoïde. En effet, la masse volumique importante de l'ensemble ARN polymérase-ribosomes-protéines en cours de synthèse pourrait limiter les mouvements moléculaires au cœur du nucléoïde. Dans ce travail nous avons exploré les relations entre la dynamique du chromosome et l'expression génique. Selon notre hypothèse, les conditions environnementales modifient la conformation du chromosome qui influence l'expression génique. Cette hypothèse est testée chez la bactérie phytopathogène *Dickeya dadantii* en combinant des approches de génétique moléculaire à de la microscopie à haute résolution. Cette bactérie fait face durant le processus infectieux à une succession de stress lors de l'infection de la plante dont les stress acide, oxydant et osmotique. L'analyse de nombreux transcriptomes de cette bactérie cultivée dans des conditions variées rencontrées au cours de la pathogénèse a révélé l'existence de domaines d'expression chromosomique dans lesquels les gènes sont activés ou réprimés de manière cohérente en réponse aux stress environnementaux. Ces domaines sont transitoires et stress spécifiques et leur structuration est modulée par les NAPs et le niveau de surenroulement de l'ADN. *D. dadantii* s'avère donc être un modèle de choix pour ces investigations.

L'objectif principal de ma thèse a été d'approfondir les connaissances sur le mode de régulation globale émergent associant la dynamique du chromosome bactérien et l'expression génique en réponse aux variations des conditions environnementales. Afin

d'étudier ce lien nous avons mis à profit les spécificités fonctionnelles du système *parS*/ParB pour marquer différents domaines du chromosome de *D. dadantii* dont l'expression est modulée par les conditions environnementales. Le système *parS*/ParB a ainsi permis de suivre l'évolution de la localisation spatiale d'un locus particulier en réponse aux variations des conditions environnementales via la microscopie.

Dans un premier temps nous avons étudié la dynamique du chromosome de *D. dadantii* au cours de la croissance. Ceci afin d'en déduire la chorégraphie du chromosome chez cet organisme phytopathogène. Dans un second temps, nous avons analysé la localisation subcellulaire de 10 loci marqués répartis dans différents domaines et à proximité de gènes marqueurs des conditions rencontrées durant la pathogénèse (stress oxydant, osmotique et acide ; présence ou non de composés pectiques). Nos résultats permettent d'établir une corrélation entre l'expression et la localisation subcellulaire de loci selon les conditions rencontrées par *D. dadantii* durant le processus infectieux, confortant ainsi notre hypothèse.

Mots clé : Bactérie, *Dickeya dadantii*, expression génique, dynamique du chromosome, nucléoïde, microscopie, stress environnementaux.

Abstract

Bacterial adaptation to change in environmental conditions requires a swift reorganization of metabolism mediated by transcriptional regulation of gene expression. This metabolic adjustment is critical for both bacterial survival and bacterial pathogenicity. Bacteria detect and convert the environmental stimulus into specific cellular responses in order to thrive in varying environments. Recent studies suggest that bacterial gene expression is governed by the organisation and structural dynamics of chromosomal DNA. This organisation involves different actors, in particular the nucleoid associated proteins (NAPs) which as thought to influence both the chromatin structure and transcription initiation of a large number of genes. Traditional transcription factors, modulating a relatively reduced number of genes, work under specific architectural constraints imposed by NAPs. Moreover, recent work realised on RNA polymerase activity during *Escherichia coli* growth, suggests that when a chromosomal region is strongly transcribed, it is exposed at the surface of the nucleoid and vice versa when a region is less expressed it is buried in the heart of the nucleoid. Indeed, the high density of the RNA polymerase-ribosome-protein assembly during synthesis could limit the molecular movements in the nucleoid core. However, few data confirming this hypothesis are available in the literature. In this work we explored the relationship between chromosome dynamics and gene expression in relation to variations in environmental conditions. According to our hypothesis, these conditions modify the conformation of the chromosome which influences gene expression. This hypothesis is tested in the plant pathogenic bacterium *Dickeya dadantii* by combining molecular genetic approaches with high resolution microscopy. This bacterium faces a succession of stresses during the infection process, including acid, osmotic and oxidative stresses. Analysis of numerous transcriptomes of *D. dadantii* grown under a variety of conditions encountered during pathogenesis revealed the existence of chromosomal expression domains in which genes are coherently activated or repressed in response to environmental stress. These domains are transient and stress specific and their patterning is modulated by NAPs and the level of DNA supercoiling. *D. dadantii* is therefore a model of choice for these investigations.

The main objective of my thesis project was to gain insight into the emerging global regulatory mode linking bacterial chromosome dynamics and gene expression in response to

changes in environmental conditions. In order to study this link, we took advantage of the functional specificities of the *parS*/ParB system to tag different domains of the *D. dadantii* chromosome whose expression is modulated by the environmental conditions encountered during pathogenesis. Indeed, the introduction of a *parS* sequence (20 to 80 bp) within a chromosomal locus allows its visualisation thanks to the interaction with the ParB protein coupled to a fluorescent marker of the GFP (Green Fluorescent Protein) or RFP (Red Fluorescent Protein) type; this ParB-GFP or ParB-RFP protein binds in a cooperative and specific manner to the corresponding *parS* sequence, forming a nucleation spot that amplifies the emitted signal. Thus, we were able to follow the evolution of the spatial localisation of the different loci selected in response to variations in environmental conditions via high-definition microscopy.

As the tagged loci were globally well distributed on the chromosome, we first studied the dynamics of the *D. dadantii* chromosome during growth. In a second step, we analysed the subcellular localisation of 10 tagged loci distributed in different domains and in the vicinity of marker genes of the conditions encountered during pathogenesis (oxidative, osmotic and acidic stress; presence or absence of pectic compounds). Our results allow us to establish a correlation between the expression and the subcellular localisation of the loci according to the conditions encountered by *D. dadantii* during the infectious process, thus confirming our hypothesis.

Keywords : Bacteria, *Dickeya dadantii*, gene's expression, chromosome dynamics, nucleoid, microscopy, environmental stress.

Remerciements

Je tiens dans un premier temps à remercier les membres de mon jury pour avoir accepté d'évaluer ce travail, merci à Marie-Anne Barny, Bianca Sclavi et Patrick Sobertzko. Merci aux membres de mes comités de suivi de thèse pour m'avoir suivi et accompagnée durant ces quatre ans, merci à Alexandre Soulard et Isabelle Valet Gely pour leurs remarques toujours constructive et merci à Claire Prigent-Combaret pour avoir été la tutrice et l'examinatrice de ces travaux.

Un immense merci à William Nasser mon directeur de thèse pour tout le travail accomplis durant ces années et toutes les connaissances partagées. Merci à Sylvie Reverchon pour m'avoir encadré lors de mon stage et avoir partager ces connaissances scientifiques intarissable. Merci à toutes les équipes pédagogiques et tous les enseignants qui m'ont fait découvrir et apprendre la richesse de l'enseignement. Je tiens remercier particulièrement Christian Lesterlin pour avoir partagé son expertise avec moi, cela fut une joie d'avoir l'occasion de travailler avec toi et toute l'équipe de TACC. Merci en particulier à Annick pour le goûter caché en cas d'urgence.

De l'UMR5240, merci à Véronique tu as été là lors de mon stage et le début de la thèse merci d'avoir veiller sur moi. Merci à Yvan pour toutes nos conversation politique, philosophique et j'en passe. A nos amis extrêmophiles, merci à Yoann pour m'avoir appris à bricoler (et pas qu'en science parce qu'un spectrophotomètre c'est aussi facile à réparer qu'un vélo) et à Philippe pour ces conseils presque sans sarcasmes. Merci à Elodie pour des debriefs cinéma très tôt au labo et sa collection inépuisable de noms pour blattes. Je tiens à remercier Ruru, pour avoir eu des réponses aux questions les plus bizarres que j'ai pu lui poser, d'être toujours présente en cas de besoin et de ne pas m'avoir laisser jouer avec n'importe quoi. Merci à Fabiola avec laquelle j'ai pu réapprendre l'espagnol et les chansons des mauvais jours de manips.

Aux membres de l'équipe CRP merci à tous. Merci à Florence pour sa pédagogie hors du commun, impossible de ne pas comprendre si c'est toi qui expliques. A Jess pour son aide et son soutien lors des derniers moments de ma thèse et notamment les pauses gras en cas de souci au microscope. A Amandine et Camille pour leur précieuse aide technique sans laquelle rien n'aurais pu aboutir. A Zahar pour sa bonne humeur et ses idées. Merci à

Théophile parce que tu n'es pas complotiste mais quand même. Un grand merci à Elsa, j'ai dû finir la thèse sans toi mais partager le début fut un réel bonheur mi amiga. Merci à Simon qui nous encourage à ne pas quitter, à Maiwenn, à Florelle pour les concours de chants pendant les étalements de dilutions, à Raphaël, à Pauline, à Sam, à Bilel, à Gabin, à Sara et à Shiny.

Merci à mes amis biologiste ou non de Lyon, de Savoie, du Mans, ou du SPF. Merci pour toutes les pizzas, les randonnées, les burgers quiz et les brunchs partagés ensemble. Merci à mes frères pour leur confiance et pour qui je serais à jamais la « petite » même après une thèse. Un dernier, le plus fort et le plus grand merci à ma mère qui avant tous m'as appris la meilleure leçon du monde : soit toi-même et tout ira bien ... et puis si les gens ne sont pas contents tant pis pour eux !!

Table des matières

RESUME.....	5
ABSTRACT	7
REMERCIEMENTS.....	9
TABLE DES MATIÈRES	11
LISTE DES ABREVIATIONS	13
LISTE DES FIGURES.....	15
LISTE DES TABLEAUX	17
PARTIE I : INTRODUCTION ET CONTEXTE DE L'ETUDE	19
1) EXPRESSION GENIQUE ET ACCLIMATATION CHEZ LES BACTERIES.....	21
A) <i>Acclimatation des bactéries à leurs environnements</i>	21
B) <i>La régulation de la transcription</i>	24
C) <i>La structure dynamique de la chromatine</i>	31
D) <i>La dynamique du chromosome comme acteur de la régulation</i>	55
2) <i>DICKEYA DADANTII</i> , UNE ENTEROBACTERIE PHYTOPATHOGENE.....	59
A) <i>Evolution de la taxonomie du genre Dickeya</i>	60
B) <i>Cycle de vie</i>	63
C) <i>Pouvoir pathogène et virulence</i>	65
3) OBJECTIFS DE LA THESE.....	72
PARTIE II : MATERIEL ET METHODES	74
1) SOUCHES BACTERIENNES ET PLASMIDES	76
2) TECHNIQUES GLOBALES DE BIOLOGIE MOLECULAIRE ET DE GENETIQUE	79
A) <i>Transfert d'ADN par la technique de la transduction</i>	80
B) <i>Extraction des ARN : méthode du « phénol chaud »</i>	81
C) <i>Rétrotranscription</i>	82
D) <i>PCR quantitative en temps réel (q-PCR)</i>	83
E) <i>Analyses bio-informatique et statistique</i>	84
3) INSERTION DE SEQUENCES <i>parS</i> DANS LE GENOME DE <i>DICKEYA DADANTII</i>	84
A) <i>Choix de la région à marquer</i>	84
B) <i>Clonages des régions génomiques où seront insérés les sites parS</i>	87
C) <i>Insertion des cassettes parS</i>	88
D) <i>Construction de souches portant un double étiquetage</i>	91
4) MISE AU POINT DES CONDITIONS DE CULTURES OPTIMALES POUR LA VISUALISATION DES CELLULES EN MICROSCOPIE	92
A) <i>Obtention de bactéries fluorescentes</i>	92
B) <i>Mise au point des conditions de cultures et variations</i>	92
C) <i>Stabilité plasmidique chez Dickeya dadantii</i>	93
D) <i>Impact des insertions parS sur la bactérie</i>	94
5) ANALYSES DES MUTANTS DES PROTEINES ASSOCIEES AU NUCLEOÏDE	95
A) <i>Construction des mutants NAPS</i>	95
6) MICROSCOPIE FLUORESCENTE A HAUTE RESOLUTION	96
A) <i>Visualisation des spots de fluorescence sur cellule vivante en direct</i>	96
B) <i>Analyses d'images</i>	97
PARTIE III : RESULTATS	99
1) STRATEGIE RETENUE POUR LA CONSTRUCTION DES SOUCHES DEDIEES A LA VISUALISATION DE LA DYNAMIQUE DU CHROMOSOME EN TEMPS REEL	101
A) <i>Réplication du chromosome</i>	106
B) <i>Dégradation de la pectine</i>	106
C) <i>Mobilité</i>	107

D) Les marqueurs du stress osmotique	107
E) Les marqueurs du stress oxydant.....	108
F) Les marqueurs du stress acide	108
2) LE SYSTEME PARS-PARB NE MODIFIE PAS SIGNIFICATIVEMENT LA CROISSANCE DE <i>D. DADANTII</i> AINSI QUE L'EXPRESSION DES GENES VOISINS DES LOCI SELECTIONNES	112
3) TENTATIVE DE CONSTRUCTION D'UN SYSTEME PLASMIDIQUE PORTANT LES PROTEINES PARB RELATIVEMENT STABLE CHEZ <i>D. DADANTII</i>	118
4) TENTATIVES D'AMELIORATION DE LA STABILITE DU PLASMIDE P2973.....	123
5) L'ORIGINE ET LE TERMINUS DE REPLICATION RESTENT STABLES DANS NOS CONDITIONS D'ETUDE	126
6) LE VOLUME DU NUCLEOÏDE DE <i>D. DADANTII</i> DEMEURE STABLE DANS LES DIFFERENTES CONDITIONS D'ETUDES	128
7) ANALYSE DU PROFIL DE SEGREGATION DE DIFFERENTS LOCI CHROMOSOMIQUE CHEZ <i>D. DADANTII</i>	132
A) Observation du chromosome de <i>Dickeya dadantii</i> dans les conditions standard.....	132
B) Les loci <i>pelA-pelB</i> ne sont pas spatialement colocalisés dans nos conditions expérimentales	136
8) IMPACT DES STRESS ENVIRONNEMENTAUX SUR LA LOCALISATION SUBCELLULAIRE DES LOCI.....	139
A) Analyse du couple <i>pelA/pelB</i> dans les différentes conditions de stress	140
B) Analyse du couple <i>ousA/fliT</i> marqueur des stress osmotique.....	143
C) Le couple <i>asr</i> et <i>pggS</i> , marqueurs des stress acide et osmotique présentent une relocalisation modérée.....	146
D) Le marqueur du stress oxydant <i>ahpC</i> présente un profil de réponse atypique.....	149
PARTIE IV : DISCUSSION ET PERSPECTIVES	153
PARTIE V : ANNEXES.....	165
PARTIE VI : REFERENCES.....	185

Liste des abréviations

ADN : Acide désoxyribonucléique

ATP : Adenosine tri-phosphate

ARN : Acide ribonucléique

D.O : Densité Optique

FIS : Factor for Inversion Stimulation

GFP : Green Fluorescent Protein

HNS : Histone like Nucleoid Structured protein

HU : Histone like protein from strain U93

IHF : Integration Host Factor

kb : kilo paire de base (=1000pb)

Mb : Méga paire de base (=1000000 pb)

NAP : Nucléoid Associated Protein

OriC : Origine de réplication

PCR : Polymerase Chain Reaction

Pel : Pectate lyase

pb : paire de base

RFP : Red Fluorescent Protein

ROS : Espèces réactives de l'oxygène

Ter : Terminus de réplication

Liste des figures

Figure 1 : Acclimatation des bactéries aux changements environnementaux.	22
Figure 2 : L'ARN polymérase.	26
Figure 3 : Le promoteur.....	28
Figure 4 : L'initiation de la transcription chez les bactéries.	30
Figure 5 : Structure 3D de l'ADN	31
Figure 6 : Surenroulement de l'ADN observé chez le virus du polyome.....	31
Figure 7 : Le surenroulement du chromosome bactérien.....	33
Figure 8 : Effet du niveau de surenroulement de l'ADN sur la structure des promoteurs.	34
Figure 9 : Modulation de la topologie globale de l'ADN par les topoisomérases.....	36
Figure 10 : H-NS.....	39
Figure 11 : FIS.	41
Figure 12 : HU.....	42
Figure 13 : IHF.....	43
Figure 14 : LRP.....	44
Figure 15 : Actions des protéines NAPs.....	46
Figure 16 : Organisation du chromosome bactérien.....	47
Figure 17 : Localisation de l'ARN polymérase en fonction de la phase de croissance et en condition de stress.	48
Figure 18 : Principe de l'approche HI-C.....	50
Figure 19 : Schéma intégratif de l'organisation du chromosome.	51
Figure 20 : Impact de la protéine associée au nucléoïde ROK de <i>Bacillus subtilis</i> sur la formation des superboucles.	52
Figure 21 : Densitométrie des gènes dont l'expression est modulée par la topologie de l'ADN sur le chromosome bactérien.	54
Figure 22 : Représentation de l'encombrement cytoplasmique bactérien	55
Figure 23 : Schéma représentant le niveau d'enroulement de l'ADN en fonction des disponibilité en ATP.....	57
Figure 24 : Surenroulement de l'ADN médié par l'ARN polymérase.	58
Figure 25 : Impact de la transcription sur la localisation subcellulaire des gènes.	59
Figure 26 : Le genre <i>Dickeya</i>	61
Figure 27 : Symptômes d'une infection par <i>Dickeya</i>	62
Figure 28 : Cycle de vie de <i>Dickeya dadantii</i>	64
Figure 29 : Alignement des génomes des espèces de <i>D. dadantii</i> , <i>D. dianthicola</i> et <i>D. solani</i>	65
Figure 30 : Les facteurs de la virulence et d'acclimatation de <i>Dickeya dadantii</i>	67
Figure 31 : Réseau de régulation des facteurs de virulence chez <i>D.dadantii</i> ..	70
Figure 32 : Répartition périodique des gènes co-régulés sur le chromosome.	72
Figure 33 : TA Cloning.....	87
Figure 34 : Clonage slic.....	89
Figure 35 : Protocole de recombinaison en milieu bas phosphate.....	91
Figure 36 : Clonage Teda.....	94
Figure 37 : Montage des lames sur coussin d'agar.	96
Figure 38 : Représentation schématique de la localisation des spots de fluorescence.....	98
Figure 39 : Schéma représentant la méthode de marquage reposant sur l'utilisation du système <i>parS/ParB</i>	102

Figure 40 : Organisation des différents domaines d'expression cohérents (CODOs) de <i>D. dadantii</i> et localisation des différents sites d'insertion <i>parS</i> .	103
Figure 41 : Les loci ciblés sont impliqués dans l'acclimation ou la virulence.	109
Figure 42 : Expression relative des gènes marqueur aux voisinages des insertions <i>parS</i> .	110
Figure 43 : Représentation des constructions génétiques avec insertion <i>parS</i> .	112
Figure 44 : Protocole expérimental permettant l'étude de l'impact du système <i>parS</i> /ParB sur la croissance bactérienne.	113
Figure 45 : Mesure de la croissance de la souche de <i>Dickeya dadantii</i> sauvage par mesure de la D.O à 600nm au « Técan Spark ».	114
Figure 46 : Mesure de la croissance de la souche de <i>Dickeya dadantii</i> possédant des insertions <i>parS</i> au voisinage de l'origine (<i>oriC</i>) et du terminus de réplication (<i>ter</i>) par mesure de la D.O à 600nm au « Técan Spark ».	115
Figure 47 : Mesure de la croissance de la souche de <i>Dickeya dadantii</i> possédant des insertions <i>parS</i> au voisinage du gène <i>ousA</i> et du gène <i>fliT</i> par mesure de D.O à 600nm au « Técan spark ».	116
Figure 48 : Quantification de l'expression relative des gènes possédant des insertions <i>parS</i> dans leur région intergénique par qPCR.	118
Figure 49 : Schéma représentant le plan expérimental permettant l'étude de la variation plasmidique chez <i>D. dadantii</i> .	119
Figure 50 : Stabilité des plasmides chez <i>Dickeya dadantii</i> .	122
Figure 51 : Localisation des loci <i>oriC</i> et <i>ter</i> dans les différentes conditions.	128
Figure 52 : Aspect du chromosome en fonction des conditions de stress.	129
Figure 53 : Physiologie de <i>Dickeya dadantii</i> dans les différentes conditions.	130
Figure 54 : Stratégie de marquage de la NAP HU.	131
Figure 55 : Observation au microscope à fluorescence des souches de <i>Dickeya dadantii</i> marquées grâce à des étiquettes <i>parS</i> .	133
Figure 56 : Localisation des insertions des gènes marqueurs sur le chromosome.	134
Figure 57 : Ségrégation chromosomique des loci.	136
Figure 58 : Localisation des spots en fonction de la position des gènes sur le chromosome.	137
Figure 59 : Localisation du gène <i>pelB</i> par rapport au positionnement du gène <i>pelA</i> .	139
Figure 60 : Localisation du locus <i>pelB</i> en fonction des stress appliqués.	141
Figure 61: Localisation du locus <i>pelA</i> dans les différentes conditions.	142
Figure 62 : Localisation du locus <i>ousA</i> dans les différentes conditions.	144
Figure 63: Localisation du locus <i>fliT</i> dans les différentes conditions.	145
Figure 64 : Localisation du locus <i>asr</i> dans les différentes conditions.	147
Figure 65 : Localisation du locus <i>pggS</i> dans les différentes conditions.	148
Figure 66 : Marquage et expression du locus <i>ahpC</i> .	150
Figure 67 : Localisation du locus <i>kdul</i> dans les différentes conditions.	151
Figure 68 : Modèle de ségrégation des chromosomes.	157
Figure 69 : Plasmide permettant l'observation des relocalisation en fonction de l'expression chez <i>E. coli</i> .	160
Figure 70 : Expression relative des gènes possédant des insertions <i>parS</i> en présence de novobiocine.	162
Figure 71 : Expression relative des loci marqués dans les mutants NAPs.	164

Liste des tableaux

Tableau 1 : Souches utilisées ou construites durant l'étude.	77
Tableau 2 : Plasmides utilisés ou construits durant l'étude.....	78
Tableau 3 : Antibiotiques utilisés durant l'étude avec les concentrations d'utilisation.	79
Tableau 4 : Amorces de qPCR utilisées durant l'étude.	84
Tableau 5 : Amorces PCR utilisées durant l'étude.	86
Tableau 6 : Voisinage des insertions <i>parS</i>	105
Tableau 7 : Récapitulatif des conditions de cultures testées.....	125

Partie I : Introduction et contexte de l'étude

1) Expression génique et acclimatation chez les bactéries

A) Acclimatation des bactéries à leurs environnements

Les bactéries sont confrontées à des environnements fluctuants et doivent adapter leur état physiologique et métabolique pour survivre à ces conditions changeantes. Elles peuvent vivre sous différents états : l'état planctonique libre en milieu liquide ou l'état de biofilm fixé sur un support biotique ou abiotique. Elles peuvent interagir avec un hôte soit comme symbiotes, soit comme pathogènes. Elles peuvent être confrontées à d'autres micro-organismes via des interactions coopératives ou compétitives. L'ensemble de ces situations nécessite la synthèse de macromolécules particulières adaptées aux différents modes de vie. Cette nécessité d'acclimatation peut être illustrée par le cas des bactéries pathogènes qui sont confrontées à des difficultés particulières lors de l'interaction avec l'hôte : par exemple acquérir des oligoéléments et des nutriments en quantité limitée ou échapper aux réactions de défense de l'hôte et déclencher le processus pathogène. Ces différents processus d'acclimatation nécessitent une régulation fine et précise de l'expression génique qui joue un rôle majeur dans l'adaptation des bactéries aux fluctuations environnementales (figure 1).

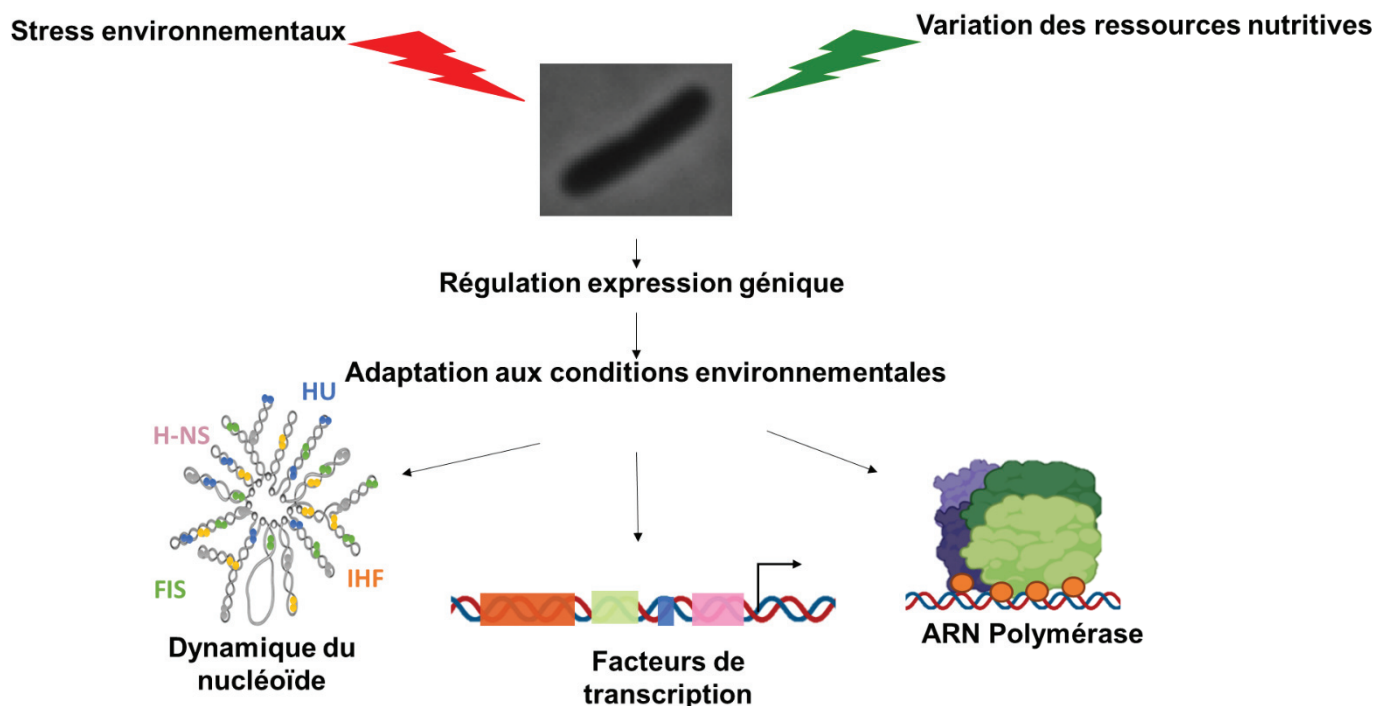


Figure 1 : Acclimatation des bactéries aux changements environnementaux. Les stress environnementaux et les variations des ressources nutritives forcent les bactéries à continuellement s'adapter. Elles perçoivent et convertissent les stimuli environnementaux en une réponse cellulaire spécifique pour survivre et se développer dans les milieux auxquels elles sont confrontées. Ce processus implique une modulation de l'expression génique. Cette régulation fait intervenir différents acteurs, notamment les protéines associées au nucléoïde (NAPs : H-NS, IHF, HU et FIS sur la figure) qui structurent le nucléoïde et modulent sa dynamique, les facteurs de transcription (FTs) qui agissent sur l'initiation de la transcription en inhibant ou en recrutant l'ARN polymérase.

Les données récentes suggèrent que l'organisation et la dynamique des chromosomes sont des acteurs essentiels dans la régulation de l'expression génique aussi bien chez les eucaryotes (Tiana and Giorgetti, 2018) que chez les procaryotes (Bakshi et al., 2015; Moffitt et al., 2016). Chez les bactéries, la topologie de l'ADN est très sensible aux conditions environnementales et les changements du niveau d'enroulement de l'ADN modulent la distribution des facteurs de transcription et de l'ARN polymérase (ARNP) dans le génome. Ainsi, chez différentes bactéries pathogènes, notamment *Salmonella enterica*, *Shigella flexneri* ou encore *D. dadantii*, la topologie de l'ADN coordonne l'expression des fonctions de virulence et les programmes d'acclimatation aux conditions rencontrées dans l'hôte (Dillon and Dorman, 2010; Reverchon et al., 2016).

Chez les bactéries, le chromosome se matérialise généralement par une molécule unique d'ADN circulaire double brin. Il est organisé en une structure relativement compacte.

A titre d'exemple, le chromosome d'une bactérie telle qu'*Escherichia coli*, contenant environ 4,6 millions de paires de bases et mesurant près de 1,5 mm, doit être condensé approximativement 1000 fois pour pouvoir être contenu dans une cellule de 2 μm de long. Cette structure compacte, communément appelée nucléoïde, n'est pas localisée dans un compartiment spécifique comme le noyau des cellules eucaryotes. Elle est noyée dans le cytoplasme bactérien et est constituée principalement d'ADN (60%) mais aussi d'ARN (30%) et de protéines (10%). Le nucléoïde présente, par ailleurs, une structure dynamique dont l'organisation évolue en fonction des variations des conditions environnementales et physiologiques. Les exigences de compaction et de variation de l'expression génique nécessitent un haut niveau d'organisation spatiale du nucléoïde. La structuration du chromosome bactérien est un processus finement régulé dont les principaux acteurs sont les macromolécules du cytoplasme telles que les protéines et les ARNs qui sont responsables de l'encombrement cytoplasmique, les ADN topoisomérases essentiellement l'ADN gyrase et la topoisomérase I qui sont des enzymes qui modulent la topologie globale de l'ADN et des protéines architecturales de faible poids moléculaire et abondantes, les NAPs qui exercent des fonctions similaires à celles des protéines histones spécifiques des eucaryotes. Les NAPs modulent l'architecture locale du nucléoïde et agissent comme des régulateurs globaux en coordonnant l'expression d'un grand nombre de gènes (Dillon and Dorman, 2010).

Ainsi la structuration du chromosome bactérien est considérée comme un élément clé de la régulation de l'expression génique (Dillon and Dorman, 2010; Travers and Muskhelishvili, 2005). La structuration et la dynamique du chromosome bactérien seraient également impliquées dans la localisation subcellulaire des ARNm. En effet, des travaux ont montré une faible diffusion des ARNm qui restent localisés à proximité immédiate de leur site de transcription, créant une compartimentation subcellulaire des protéines dépendante de la carte génétique (Kuhlman and Cox, 2012; Montero Llopis et al., 2010). Même si des études récentes tendent à nuancer le caractère général de ce processus (Kannaiah et al., 2019), il est raisonnable d'imaginer que cette compartimentation pourrait avoir des effets bénéfiques pour la cellule dans certains cas, notamment en favorisant les interactions entre protéines codées par des gènes situés à proximité sur le chromosome. La faible diffusion des ARNm et la compartimentation subcellulaire qui en découle entrainerait donc une pression positive pour que les gènes codant des protéines qui interagissent entre elles ou dont les activités sont

interdépendantes restent à proximité sur le chromosome. Cette pression positive est plus importante pour les protéines instables dont la durée de vie pourrait être augmentée lors de la formation de complexes multiprotéiques. La dynamique du chromosome serait également impactée par la localisation cellulaire des protéines en cours de synthèse. Ainsi les ARNm codant des protéines membranaires sont essentiellement retrouvés associés à la membrane cytoplasmique du fait du phénomène de transertion (Korkmazhan et al., 2017; Moffitt et al., 2016). Cette transertion est considérée comme un processus dynamique au cours duquel de nombreux contacts membrane-ADN se forment et se rompent lors du couplage transcription, traduction et insertion des peptides en cours de synthèse dans la membrane (Norris and Madsen, 1995; Woldringh, 2002). Par ailleurs, certaines conditions, telle que le stress osmotique, induisent une compaction de la chromatine qui entrainerait une diminution de l'expression des gènes enfouis au sein du nucléoïde du fait de la difficulté d'accès pour les machineries de transcription et de traduction. En effet, la masse importante de l'ensemble ARN polymérase-ribosomes-protéines en cours de synthèse pourrait limiter les mouvements moléculaires au cœur du nucléoïde (Bakshi et al., 2014). Ainsi, il a été proposé que les gènes requis pour la croissance/survie des bactéries dans une condition donnée seraient préférentiellement exposés à la surface du nucléoïde de manière à favoriser leur expression (Lesterlin and Duabrry, 2016). Cependant, peu de données confirmant cette hypothèse sont disponibles dans la littérature. Les acteurs et les mécanismes essentiels de cette régulation sont présentés ci-dessous, avec un focus sur l'interconnexion entre la dynamique du nucléoïde et la transcription. Nous illustrerons que l'architecture du génome est essentiellement sous le contrôle des ADN topoisomérases et des protéines associées au nucléoïde et qu'elle dépend des conditions environnementales et physiologiques auxquelles les bactéries sont confrontées. Par ailleurs, nous verrons que l'organisation structurale du nucléoïde influence la transcription et vice versa que la dynamique du nucléoïde est impactée par la transcription (Kröger et al., 2018; Shen and Landick, 2019).

B) La régulation de la transcription

La transcription est soumise à une régulation complexe visant à moduler la quantité et la temporalité de la synthèse des ARNm requis. Les ARNm ainsi produits peuvent-être soumis à

des mécanismes de régulation post transcriptionnelle visant à moduler leur décodage en protéine. Enfin, les protéines peuvent subir des modifications post traductionnelles pour moduler leurs activités. Ainsi les différentes étapes du décodage de l'information génétique sont soumises à des contrôles complexes. Cependant, pour des raisons d'économie et d'optimisation de l'énergie cellulaire, la modulation de l'expression génique se fait essentiellement au niveau de l'étape de l'initiation de la transcription. Le nombre total de molécules d'ARN polymérase présentes dans les cellules d'*E. coli* est d'environ 2000, ce qui est inférieur au nombre de gènes présents dans le génome de cette bactérie (environ 4300 gènes (Blattner et al., 1997)). Lors de la phase exponentielle, 1300 molécules d'ARN polymérase sont en phase d'élongation de transcription et 700 molécules sont sous forme d'holoenzyme à la recherche de promoteurs spécifiques pour initier une nouvelle transcription. De plus, la majorité des molécules d'ARN polymérase est canalisée vers la transcription des gènes codant les ARNs stables (ARN ribosomiaux et ARN de transfert (Lewis et al., 2000)), nécessaires à la traduction. La quantité d'ARN polymérase disponible pour transcrire les quatre à cinq mille gènes de la bactérie est donc limitée. Ainsi, les différents promoteurs entrent en compétition pour la fixation de l'holoenzyme. La fixation de l'ARN polymérase et l'ouverture du complexe de transcription constitue donc les étapes clés de la régulation de l'expression génique. La question essentielle est de comprendre comment la machinerie de transcription est dirigée sur des promoteurs particuliers de manière coordonnée en fonction des conditions environnementales rencontrées par la bactérie. La distribution de l'ARN polymérase sur les différents promoteurs au sein du génome dépend essentiellement de cinq paramètres: la séquence nucléotidique des régions promotrices elle-même, la proportion relative des différents facteurs sigma qui varie en fonction des conditions physiologiques et environnementales, la présence de petits ligands tels que le ppGpp et l'ARN 6S qui interagissent avec l'ARN polymérase, la présence de régulateurs transcriptionnels, et enfin l'organisation structurale du chromosome bactérien.

a. L'ARN polymérase

Chez les bactéries, la synthèse protéique est réalisée en deux grandes étapes consistant en la transcription suivie de la traduction. Les informations stockées dans le

génomique sont transcrites par l'ARN polymérase (ARNP) en ARN message (ARNm) qui sont traduits, via la machinerie de traduction (ribosomes, ARN de transfert), en protéines. L'ensemble des ARNs est transcrit par une seule et même ARN polymérase (Ebright, 2000). Cette enzyme multimérique est constituée de cinq sous-unités protéiques : β , β' , deux sous-unités α identiques et une petite sous-unité ω . Elle existe sous deux formes différentes, l'enzyme core (ou l'apoenzyme) et l'holoenzyme, selon qu'elle est associée ou non à une sixième sous-unité : le facteur sigma (figure 2).

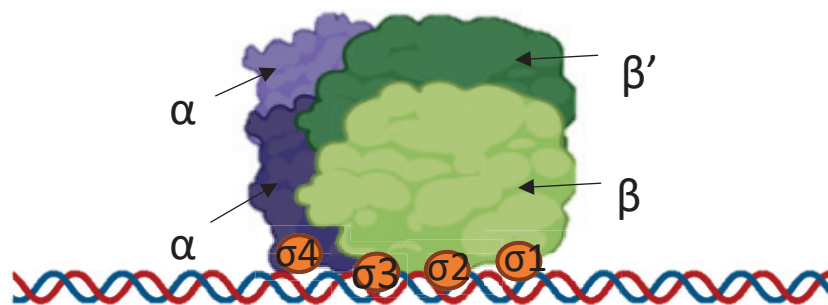


Figure 2 : L'ARN polymérase. L'enzyme core de l'ARN polymérase est constituée de cinq sous-unités protéiques (β , β' , 2 α et ω). Les sous-unités β et β' forment le site actif. Les sous-unités α sont, chacune, constituées de deux domaines fonctionnellement différents, le domaine N-terminal α NTD dont la dimérisation est responsable de l'assemblage des sous-unités β et β' et le domaine C-terminal α CTD qui est un domaine de liaison à l'ADN jouant un rôle dans l'interaction avec certains promoteurs. Ces domaines sont connectés par une région charnière flexible constituée d'une vingtaine d'acides aminés. La petite sous-unité ω semble fonctionner telle une protéine chaperon permettant le repliement correct de la sous-unité β' . Les facteurs sigma, à l'exception du facteur sigma 54 (RpoN) qui a une structure qui lui est propre, sont constitués de 4 domaines conservés σ_1 , σ_2 , σ_3 et σ_4 qui reconnaissent les différents éléments constitutifs des promoteurs.

La grande majorité des bactéries possèdent de multiples facteurs sigma. De plus, ce nombre apparaît étroitement lié à la diversité d'environnements dans lesquels le micro-organisme peut survivre. Ces facteurs sont indispensables à l'initiation de la transcription puisqu'ils assurent la reconnaissance spécifique du promoteur et permettent la fixation de l'ARN polymérase sur ce dernier. Ils réduisent, en effet, l'affinité globale de l'ARN polymérase pour l'ADN au profit d'une forte spécificité pour les séquences promotrices. Les facteurs sigma facilitent, par ailleurs, l'ouverture de la double hélice en amont du site d'initiation de la transcription qui induit l'ouverture du complexe de transcription nécessaire à l'initiation de la transcription (Gross et al., 1998; Wösten, 1998). Il existe une exception à cette règle, il s'agit

du facteur sigma 54 (RpoN) qui nécessite l'intervention de protéines activatrices possédant une activité ATPase et fournissant l'énergie nécessaire à l'ouverture la double hélice de l'ADN.

La bactérie modèle *Escherichia coli* possède un facteur sigma 70 principal (RpoD), dit végétatif, qui reconnaît la majorité des promoteurs. Il assure la transcription des gènes dits « de ménage » qui sont essentiels au métabolisme de base et sont exprimés de manière constitutive. Six autres facteurs sigma, dits alternatifs (RpoH, RpoF, RpoE, Fecl, RpoN et RpoS) ont des cibles spécifiques (Ishihama, 2000). En raison de leur caractère inductible, ces différents facteurs entrent en compétition avec le facteur sigma 70 pour s'associer avec l'enzyme core et permettre l'expression de gènes spécifiques. En effet, RpoH permet l'expression de gènes impliqués dans la protection aux variations de température, RpoF l'expression de gènes codant les flagelles, RpoE l'expression de gènes impliqués dans le métabolisme du fer, Fecl le transport du fer, RpoN le métabolisme de l'azote et enfin RpoS permet l'expression de gènes exprimés lors de la phase stationnaire. En fonction des conditions physiologiques ou environnementales des bactéries, l'activité de ces facteurs sigma va être modulée par des protéines anti-sigma qui vont piéger un facteur sigma particulier qui ne sera alors plus disponible pour s'associer avec l'enzyme core (Hughes and Mathee, 1998). A titre d'exemple, la protéine chaperon DnaK est l'anti-sigma RpoH. En absence de stress thermique, DnaK piège RpoH. Lors d'un stress thermique, le chaperon DnaK va subir un changement conformationnel et va libérer RpoH pour prendre en charge les protéines cytoplasmiques mal repliées afin de les aider à retrouver leur structure tridimensionnelle correcte. Le facteur sigma 32 (RpoH) pourra alors s'associer à l'enzyme core et permettre la transcription des gènes nécessaires à la survie au stress thermique.

b. Le promoteur

L'étape clef de l'initiation de la transcription est la reconnaissance du promoteur par l'ARN polymérase. Les différents éléments de la séquence d'ADN constituant un promoteur ont été étudiés intensivement (Busby and Ebricht, 1994). Quatre éléments différents ont été identifiés. Les deux principaux reconnus par le facteur σ sont les hexamères -10 (Pribnow, 1975) et -35 qui sont centrés à 10 et 35 paires de bases en amont du site d'initiation de la transcription et généralement distants entre eux de 16 à 19 bases. Des séquences consensus

pour les éléments -10 et -35 ont été établies : les séquences TATAAT et TTGACA constituent respectivement les consensus des hexamères -10 et -35 canoniques. Les deux autres éléments importants de la structure d'un promoteur sont l'élément -10 étendu et l'élément UP. Le -10 étendu est un motif de 3 à 4 paires de bases situé immédiatement en amont de l'hexamère -10. Il est reconnu par le domaine 3 de certains facteurs σ , notamment σ^{38} (RpoS) (Murakami et al., 2002; Sanderson et al., 2003). L'élément UP est composé d'une vingtaine de paires de bases situées en amont de l'hexamère -35. Il est reconnu par les domaines carboxy-terminaux des sous-unités α de l'ARN polymérase (Gaal et al., 2001). Ainsi, les éléments -10, -35, -10 étendus et UP assurent une fixation spécifique de l'ARN polymérase au niveau du promoteur (figure 3), mais la contribution relative de chaque élément diffère d'un promoteur à un autre. Les différences entre les séquences promotrices participent fortement à la distribution inégale de l'ARN polymérase entre les différentes unités de transcription (Browning and Busby, 2004). En effet, tous les promoteurs ne sont pas également compétents pour initier la transcription. Globalement, un promoteur est d'autant plus fort qu'il se rapproche des séquences consensus.

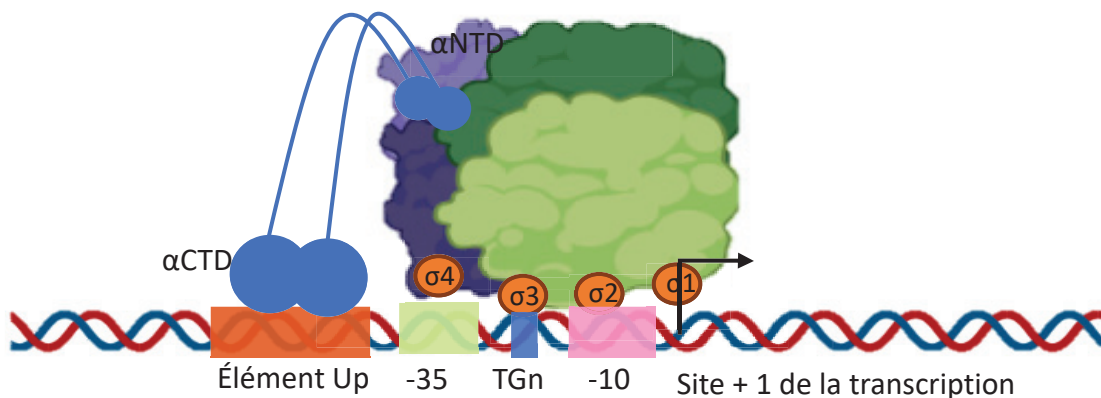


Figure 3 : Le promoteur. La région promotrice est constituée de quatre éléments différents, les éléments -10, -35, -10 étendu et UP qui assurent la fixation spécifique de l'ARN polymérase au niveau du promoteur.

c. L'initiation de la transcription

Le processus de la transcription comporte trois principales étapes : l'initiation, l'élongation et la terminaison. L'initiation de la transcription implique, comme précédemment

indiqué, la fixation de l'ARN polymérase au niveau du promoteur. Cette interaction aboutit au complexe fermé de transcription. Grâce à un phénomène d'isomérisation, le complexe fermé est transformé en un complexe ouvert de transcription via l'ouverture de la double hélice entre les positions -10 et +2 (Tomsic et al., 2001; Tsujikawa et al., 2002). La formation de la bulle d'initiation s'accompagne d'un mouvement de l'ADN simple brin matrice vers le site actif de l'ARN polymérase. Cette étape se poursuit par la formation de la première liaison phosphodiester entre les deux premiers nucléosides triphosphates. Lorsque 9 à 12 nucléosides d'ARN ont été synthétisés, le complexe d'initiation entre dans la phase d'élongation. Cette transition est marquée par un changement de conformation de l'ARN polymérase qui conduit notamment à l'élimination du facteur sigma (Ishihama, 2000). Le facteur sigma va, ainsi, pouvoir s'associer à une molécule d'enzyme core disponible pour initier une nouvelle transcription au niveau d'un autre promoteur (figure 4).

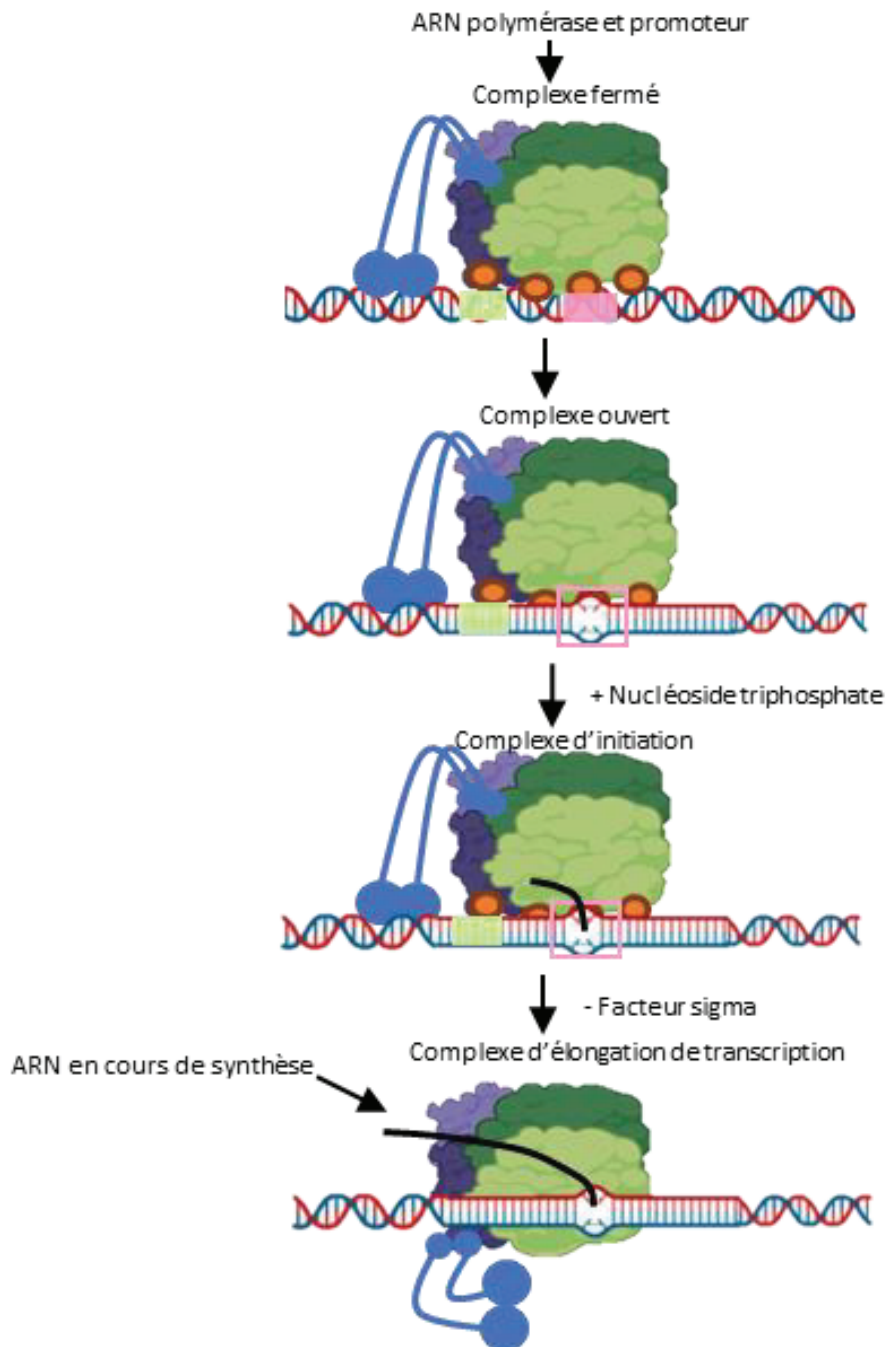


Figure 4 : L'initiation de la transcription chez les bactéries. L'initiation de la transcription implique, la fixation de l'ARN polymérase au niveau du promoteur. Cette interaction donne naissance au complexe fermé de transcription. Grâce à un phénomène d'isomérisation, le complexe fermé est transformé en un complexe ouvert de transcription par ouverture de la double hélice entre les positions -10 et +2. L'ouverture de la bulle d'initiation s'accompagne d'un mouvement de l'ADN simple brin matrice vers le site actif de l'ARN polymérase. Cette étape se poursuit par la formation de la première liaison phosphodiester entre les deux premiers nucléosides triphosphates. Lorsque 9 à 12 nucléosides d'ARN ont été synthétisés, le complexe d'initiation entre dans la phase d'élongation. Cette transition est marquée par un changement de conformation de l'ARN polymérase qui conduit notamment au relargage du facteur sigma. Le facteur sigma va, ainsi, pouvoir s'associer à une molécule d'enzyme core disponible pour initier une nouvelle transcription au niveau d'un autre promoteur

C) La structure dynamique de la chromatine

a. Le surenroulement de l'ADN

L'ADN est formé par l'appariement de deux chaînes polynucléotidiques complémentaires et antiparallèles s'enroulant autour d'un axe unique. La structure tridimensionnelle de l'ADN qui en résulte correspond à une double hélice droite (Watson and Crick, 1953), (figure 5).

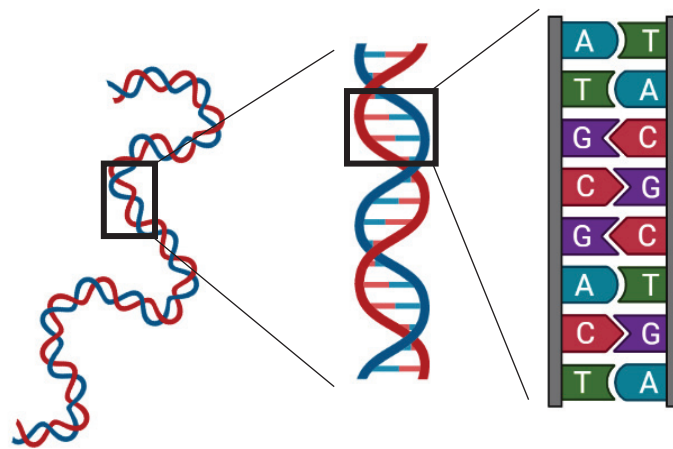


Figure 5 : Structure 3D de l'ADN. L'enroulement des deux brins d'ADN l'un autour de l'autre forme une double hélice droite.

Cette double hélice peut, à son tour, s'enrouler sur elle-même dans l'espace formant ainsi une nouvelle hélice d'ordre supérieur : on parle alors de surenroulement de l'ADN (figure 6).

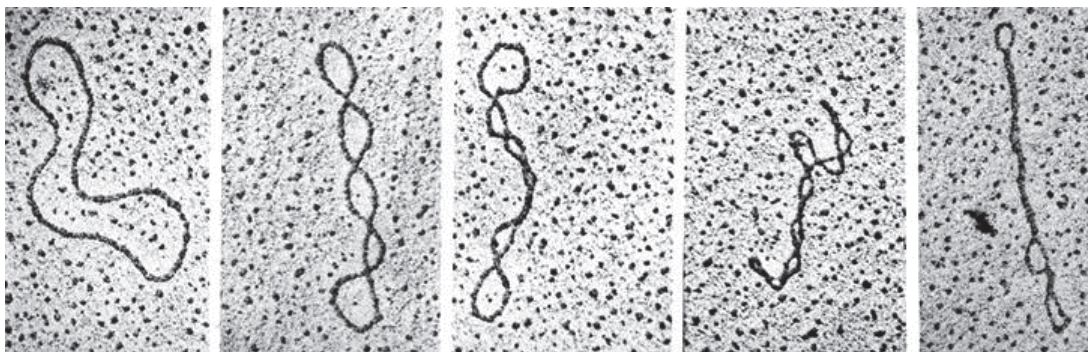


Figure 6 : Surenroulement de l'ADN observé chez le virus du polyome (d'après Vinograd et al, 1965).

Le surenroulement de l'ADN résulte de l'introduction de supertours (tours de surenroulement) qui induisent une contrainte de torsion dans la molécule d'ADN. La réponse de la double hélice à cette torsion dépend du sens, positif ou négatif, de ces supertours. L'introduction de supertours négatifs engendre l'augmentation du nombre de paires de bases par tour d'hélice par rapport à l'ADN double brin circulaire relâché (ADN dépourvu de supertours) qui possède en moyenne 10,5 paires de bases par tour d'hélice. Ceci se traduit par un désenlacement des deux brins d'ADN l'un autour de l'autre : la double hélice se desserre. Le désenlacement peut même entraîner un mésappariement local des brins d'ADN. Pour compenser ce désenlacement, la double hélice va se surenrouler sur elle-même dans le sens contraire de son hélicité : il en découle une superhélice droite. L'introduction de supertours positifs engendre une diminution du nombre de paires de bases par tour d'hélice. Ceci se traduit par un surenlacement des deux brins d'ADN : la double hélice se resserre. Pour compenser ce surenlacement, la double hélice va se surenrouler sur elle-même dans le sens de son hélicité : il en découle une superhélice gauche (figure 7). Chez la majorité des bactéries, l'ADN circulaire double brin adopte une forme surenroulée négativement. Si le surenroulement négatif de l'ADN présente l'avantage de condenser le chromosome en une structure compatible avec la taille de la cellule bactérienne, il facilite également le mésappariement local des brins de la double hélice. L'introduction de supertours négatifs dans la molécule d'ADN nécessite de l'énergie qui est apportée par l'hydrolyse de molécules d'ATP. Ainsi, ces supertours négatifs peuvent être considérés comme des réserves d'énergie (un supertour négatif = une molécule d'ATP). La relaxation de ces supertours fournit l'énergie nécessaire à la cassure des liaisons hydrogène appariant les deux brins d'ADN et permet, ainsi, l'ouverture de la double hélice (Dorman and Corcoran, 2009). Ceci favorise l'accessibilité des brins d'ADN aux différentes machineries impliquées dans les processus cellulaires relatifs à l'ADN tels que la réplication, la transcription et la recombinaison (Baker et al., 1986; Pruss and Drlica, 1989). Ces derniers sont donc considérablement influencés par la topologie de l'ADN. En effet, des données récentes suggèrent que les variations de surenroulement global affectent l'expression du génome. Ainsi chez *Escherichia coli*, une relaxation rapide de l'ADN entraîne une diminution de l'expression de 30% des gènes sensible à la relaxation (Travers and Muskhelishvili, 2005).

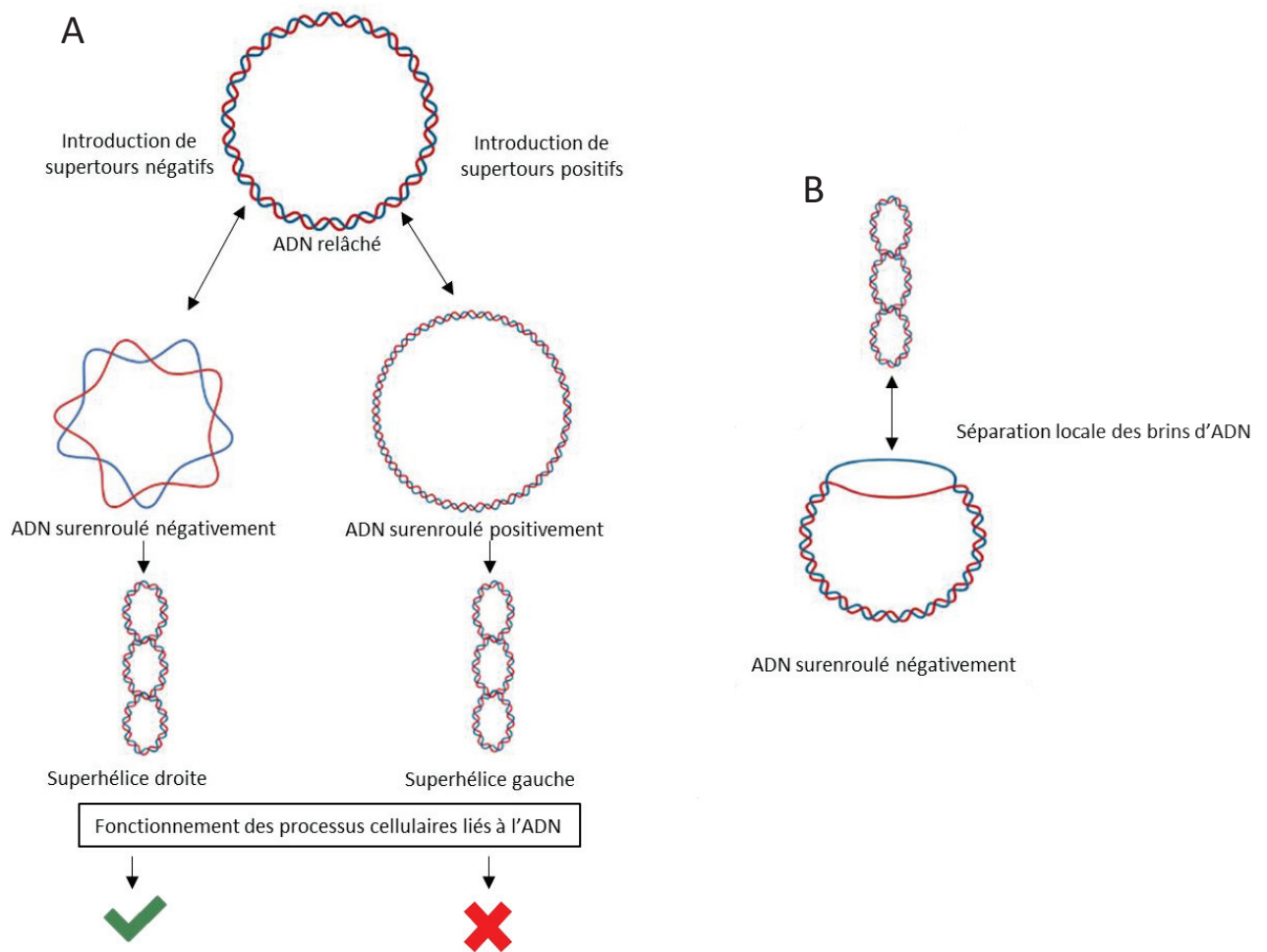


Figure 7 : Le surenroulement du chromosome bactérien. L'introduction de supertours dans l'ADN circulaire double brin relâché induit le surenroulement de l'ADN (A). Le surenroulement négatif de l'ADN favorise le fonctionnement des processus cellulaires liés à l'ADN contrairement au surenroulement positif. Chez la majorité des bactéries, l'ADN est surenroulé négativement. Toutefois, les archées hyperthermophiles ont de l'ADN avec un surenroulement positif qui stabilise la double hélice. Cette stabilisation de la double hélice est nécessaire pour vivre à des températures élevées et éviter la dénaturation de l'ADN. Le surenroulement négatif de l'ADN peut engendrer la séparation locale des deux brins de la double hélice (B).

Cette sensibilité au surenroulement est en partie liée à la structure des promoteurs. En effet, le recrutement de l'ARN polymérase au niveau du promoteur est conditionné par la reconnaissance des éléments -10 et -35 du promoteur par le facteur sigma. L'espacement entre ces deux motifs hexamériques nommé « spacer » varie de 16 paires de bases jusqu'à 19 paires de bases. L'écartement de 17 paires de bases permet de positionner les deux hexamères sur la même face de la double hélice d'ADN. Lorsque l'espacement n'est pas

optimal, la fixation de l'ARN polymérase *via* le facteur sigma nécessite un ajustement de la structure de la double hélice par le biais du surenroulement de l'ADN (figure 8).

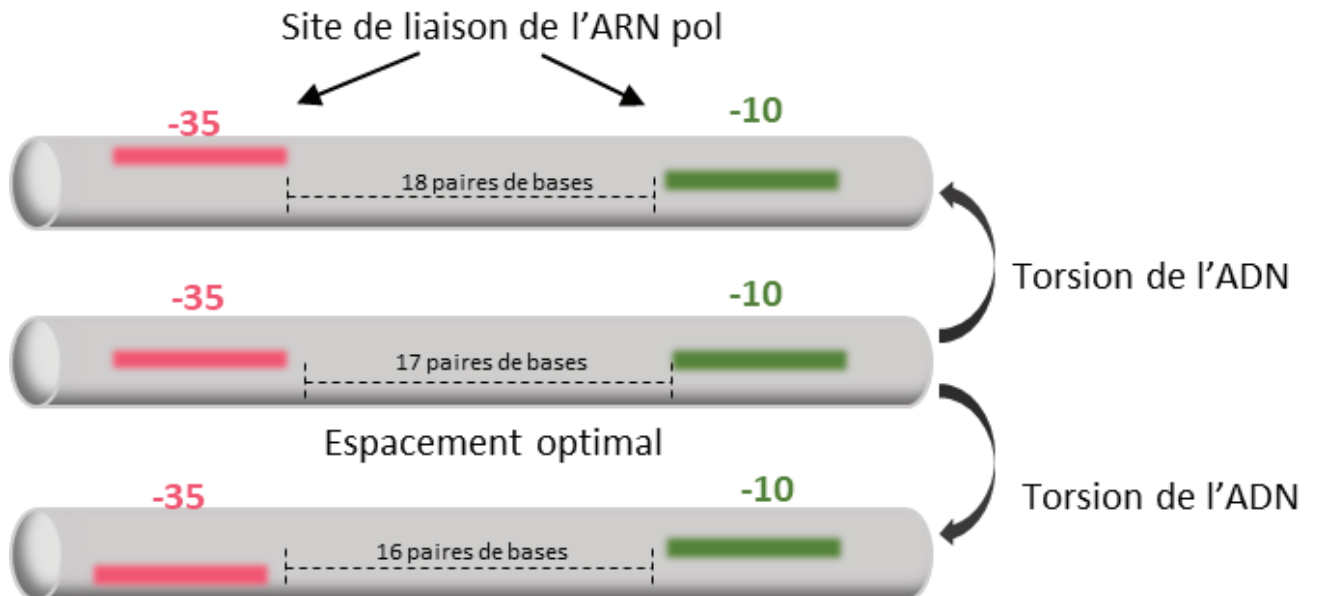


Figure 8 : Effet du niveau de surenroulement de l'ADN sur la structure des promoteurs. Le surenroulement de l'ADN en modifiant la torsion de la double hélice va permettre d'aligner ou non les éléments -35 et -10 sur une même face de l'ADN. Ainsi le surenroulement de l'ADN peut directement affecter le recrutement de l'ARN polymérase au niveau du promoteur et donc influencer l'expression génique.

En fonction de l'architecture de leur promoteur, certains gènes vont s'exprimer de façon optimale à un faible niveau de surenroulement négatif du génome alors que d'autres s'exprimeront à un haut niveau de surenroulement. Parmi les promoteurs les plus activés par le surenroulement négatif, on compte les promoteurs des gènes codant les ARNs stables, tels que les ARN de transfert et les ARN ribosomiques. Ces promoteurs ont un « spacer » de 16pb et contiennent une région riche en bases G et C située immédiatement en aval de l'hexamère -10 (Travers and Muskhelishvili, 2005). Cette région appelée « discriminator » contient plus de liaisons hydrogène que la région équivalente que l'on retrouve classiquement dans la majorité des promoteurs et qui est plutôt riche en bases A et T. L'ouverture de la double hélice d'ADN par la rupture de ces liaisons hydrogène au niveau du « discriminator » nécessite donc de l'énergie supplémentaire qui est apportée par la modification locale du degré de surenroulement de l'ADN.

b. La topologie globale de l'ADN : topoisomérase et gyrase

Les ADN topoisomérases interviennent dans l'homéostasie du niveau de surenroulement négatif global de l'ADN (Berger, 1998; Wang and Dröge, 1996; Zechiedrich et al., 2000). Chez *E. coli*, le maintien du niveau de surenroulement négatif exige les activités coordonnées et équilibrées de la topoisomérase I et de l'ADN gyrase principalement (Zechiedrich et al., 2000). La topoisomérase I favorise la relaxation de l'ADN en éliminant les supertours négatifs *via* un mécanisme indépendant de l'ATP (Wang, 1971). L'ADN gyrase est, quant à elle, une enzyme ATP-dépendante qui utilise l'énergie apportée par l'hydrolyse de l'ATP afin d'introduire des supertours négatifs dans l'ADN relâché (Gellert et al., 1976) (figure 9). L'activité de la gyrase est par conséquent corrélée à la disponibilité en énergie cellulaire ; elle est particulièrement active durant les phases de croissance rapide. Ainsi l'ADN génomique est négativement surenroulé durant la phase exponentielle de croissance pour se relâcher au fur et à mesure de la transition vers la phase stationnaire de croissance.

L'expression des gènes *gyrA* et *gyrB* codant l'ADN gyrase est stimulée par le relâchement de l'ADN (Menzel and Gellert, 1983, 1987) tandis que celle du gène *topA* codant la topoisomérase I est stimulée par le surenroulement négatif de l'ADN (Blot et al., 2006; Pruss and Drlica, 1989; Tse-Dinh, 1985; Tse-Dinh and Beran-Steed, 1988). Ainsi, la régulation de l'expression de ces gènes par le surenroulement lui-même contribue au maintien homéostatique du surenroulement négatif de l'ADN et permet d'éviter des niveaux de surenroulement extrêmes néfastes à la bactérie (Rui and Tse-Dinh, 2003).

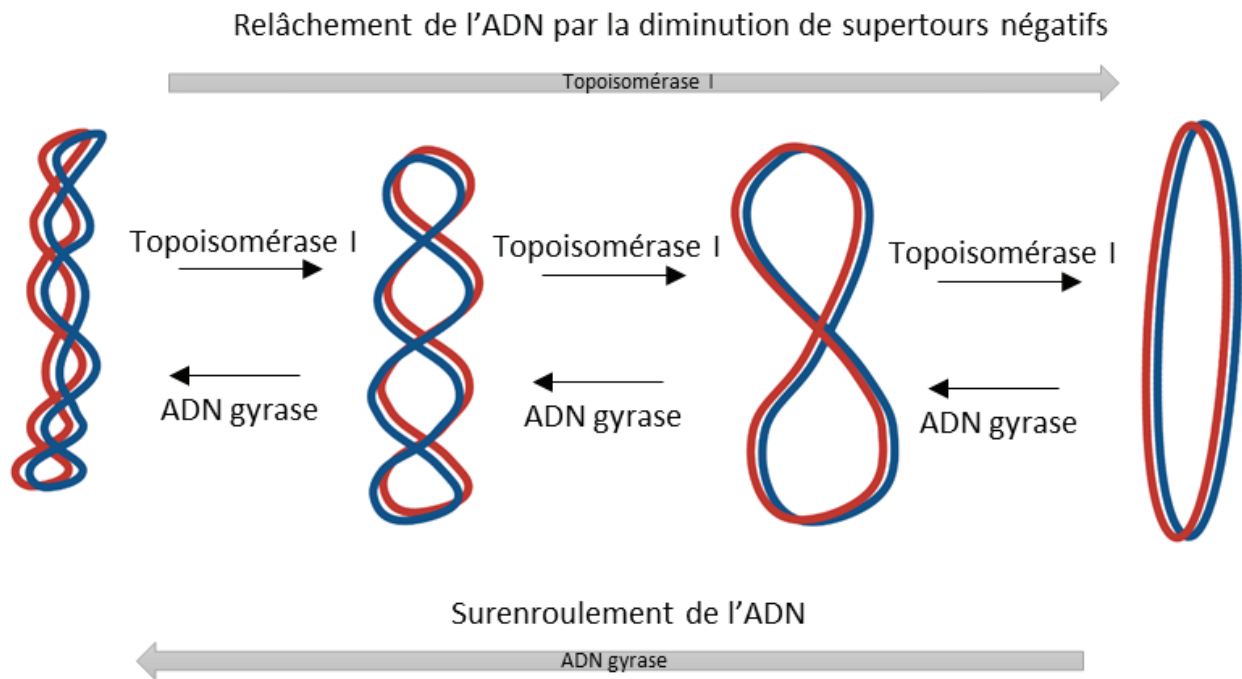


Figure 9 : Modulation de la topologie globale de l'ADN par les topoisomérases. Le niveau de surenroulement négatif de l'ADN est contrôlé par la topoisomérase I qui relâche les supertours négatifs et l'ADN gyrase qui introduit des supertours négatifs dans l'ADN relâché.

c. La topologie locale de l'ADN : le rôle des protéines NAPs

En plus de l'encombrement macromoléculaire cytoplasmique et de l'action des ADN topoisomérases, la structuration du chromosome bactérien est modulée par l'action de protéines architecturales, les NAPs, qui interagissent avec l'ADN (Azam and Ishihama, 1999). Ce sont des protéines de faible poids moléculaire contenant une proportion élevée en acides aminés basiques. Cette caractéristique leur permet d'établir des liaisons ioniques avec les groupements phosphate de l'ADN. Elles sont présentes en quantités très abondante et représentent la majorité des protéines s'associant au nucléoïde. On estime que 20% du chromosome est lié par des NAPs (Johnson et al., 2005). Les NAPs sont impliquées, non seulement, dans l'organisation et la compaction du chromosome bactérien, mais elles interviennent également dans l'ensemble des processus cellulaires impliquant l'ADN tels que la réplication, la recombinaison, et en particulier la transcription. Ainsi, elles contrôlent l'expression d'une large variété de gènes impliqués dans le métabolisme central de la cellule et dans les mécanismes d'adaptation aux stimuli externes comme la température et

l'osmolarité (Dillon and Dorman, 2010; Dorman and Corcoran, 2009; Dorman and Deighan, 2003). De récentes études de phylogénie ont révélé que les NAPs sont en général très conservées au sein des familles bactériennes (Dillon and Dorman, 2010; Dorman, 2014; Krogh et al., 2018) illustrant ainsi les rôles cruciaux de ces protéines chez les bactéries (Datta et al., 2019; Hołowka and Zakrzewska-Czerwińska, 2020). Diverses études révèlent que la liaison des NAPs peut entraîner la courbure, le pontage, l'enveloppement et le regroupement de l'ADN (Dillon and Dorman, 2010; Shen and Landick, 2019). La plupart des NAPs se lie à l'ADN avec une spécificité relativement faible ; cependant, leurs sites de liaison sont généralement riches en AT, ce qui est une caractéristique des promoteurs de gènes. En vertu de leur capacité à contraindre les niveaux d'enroulement d'ADN, les NAPs facilitent la compaction du chromosome bactérien et exercent également des effets régulateurs à longue distance sur la transcription génomique (Blot et al., 2006; Dame et al., 2020; Rimsky and Travers, 2011). Historiquement chez les bactéries Gram-négatives, la majorité des études sur les NAPs ont été réalisées chez la bactérie modèle *E. coli*. Ces travaux ont particulièrement concernés cinq NAPs majeures (H-NS, FIS, IHF, HU et LRP) en raison de leurs rôles particulièrement prononcés dans la dynamique du nucléoïde et dans la régulation de l'expression génique (Dillon and Dorman, 2010).

a. H-NS (histone-like nucleoid-structuring protein) est une protéine composée de deux domaines séparés par un linker flexible (figure 10). Des travaux récents ont révélé que la fonction de senseur des conditions médiée par H-NS s'opère principalement via son site de dimérisation 2 situé dans le domaine N-terminal comme le site de dimérisation 1 (van der Valk et al., 2017; Zhao et al., 2021). La combinaison du site 1 et du site 2 permet à H-NS de s'oligomériser et de faire des filaments d'ADN rigide, ce qui entraîne l'extinction des gènes. Le mauvais repliement du site 2 sous l'impact des conditions environnementales entraîne une conformation auto-inhibée incapable d'interagir de manière stable avec l'ADN (Zhao et al., 2021). Il s'en suit une levée de la répression de l'expression génique. H-NS considérée comme un modulateur de l'expression génétique en réponse au pH, à la température et à l'osmolarité. Elle se fixe à l'ADN *via* une séquence consensus dégénérée localisée dans des régions d'ADN présentant une structure courbe en amont et en aval des promoteurs. La liaison de l'ADN par H-NS est sensible aux facteurs environnementaux et à l'état de super enroulement de l'ADN (Dame et al., 2020; Dillon and Dorman, 2010; Ouafa et al., 2012; Zhao et al., 2021). H-NS se lie

à des sites de haute affinité qui forment des sites de nucléation et se propagent le long des séquences d'ADN adjacentes riches en AT pour réprimer fortement la transcription (Bouffartigues et al., 2007; Lang et al., 2007). H-NS est donc souvent qualifiée de "répresseur universel" (Dillon and Dorman, 2010). La manière dont H-NS réprime la transcription reste toutefois controversée. Pour certains gènes, H-NS est susceptible d'occlure la liaison de l'ARN polymérase alors que pour d'autres, il influence la transcription malgré une liaison en aval du promoteur (Song and Loparo, 2015). Des expériences à l'échelle d'une seule molécule ont permis de mieux comprendre comment H-NS régule l'expression des gènes en condensant l'ADN. Des images obtenues par microscopie à force atomique (AFM) ont révélé que cette NAP peut ponter des segments d'ADN adjacents ou former des foyers ADN-protéines compacts créant des segments d'ADN rigide appelé filaments. Les ponts d'ADN formés par H-NS pourraient dans certains cas empêcher le chargement de l'ARN polymérase ou bloquer sa translocation alors que dans d'autres cas, elles piègent l'ARN polymérase dans le complexe ouvert d'initiation de la transcription (Song and Loparo, 2015). D'autres travaux ont montré que la polymérisation d'H-NS le long de l'ADN est dépendante de la concentration en magnésium : au-dessus de 5 mM de magnésium, cette nucléation est inhibée et H-NS passe en mode pontage de l'ADN. H-NS contrôle l'expression des gènes de virulence dans une variété d'agents pathogènes, y compris *E. coli*, *Salmonella*, *Shigella flexneri*, *Vibrio cholerae* et *Dickeya dadantii* (Castang et al., 2008; Falconi et al., 1998; Nasser et al., 2001; Ouafa et al., 2012; Prosseda et al., 1998; Tran et al., 2011). Dans certains cas, H-NS peut avoir un rôle activateur dans l'expression des gènes de virulence. Chez la bactérie phytopathogène *Dickeya dadantii*, l'expression des gènes *pels*, codant les pectate lyases, facteurs de virulence majeurs, est fortement diminuée chez un mutant *hns*. Ce phénotype d'activateur est le résultat d'un contrôle indirect mettant en jeu le régulateur PecT qui est un répresseur des gènes *pels* (Nasser and Reverchon, 2002). Dans le mutant *hns*, l'augmentation de la synthèse de PecT conduit à une répression de l'expression des gènes *pels*.

Histone like Nucleoid-Structuring protein

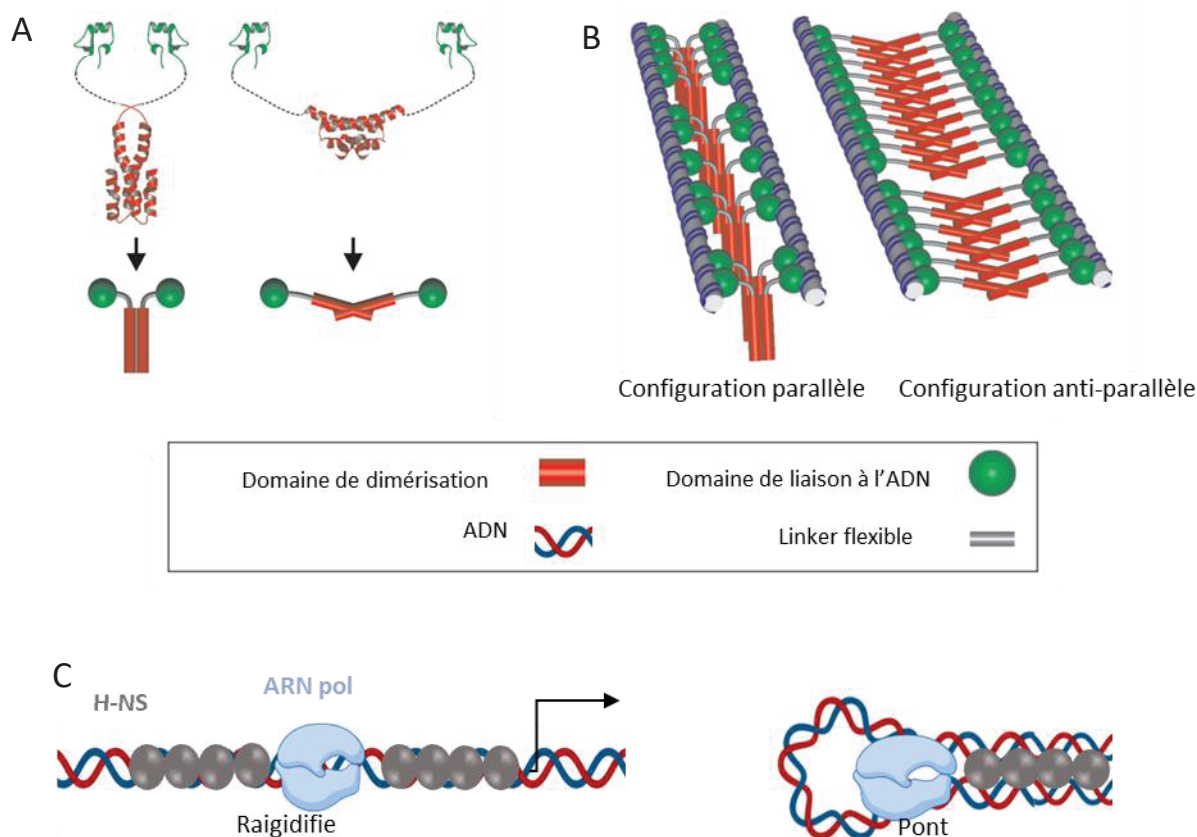
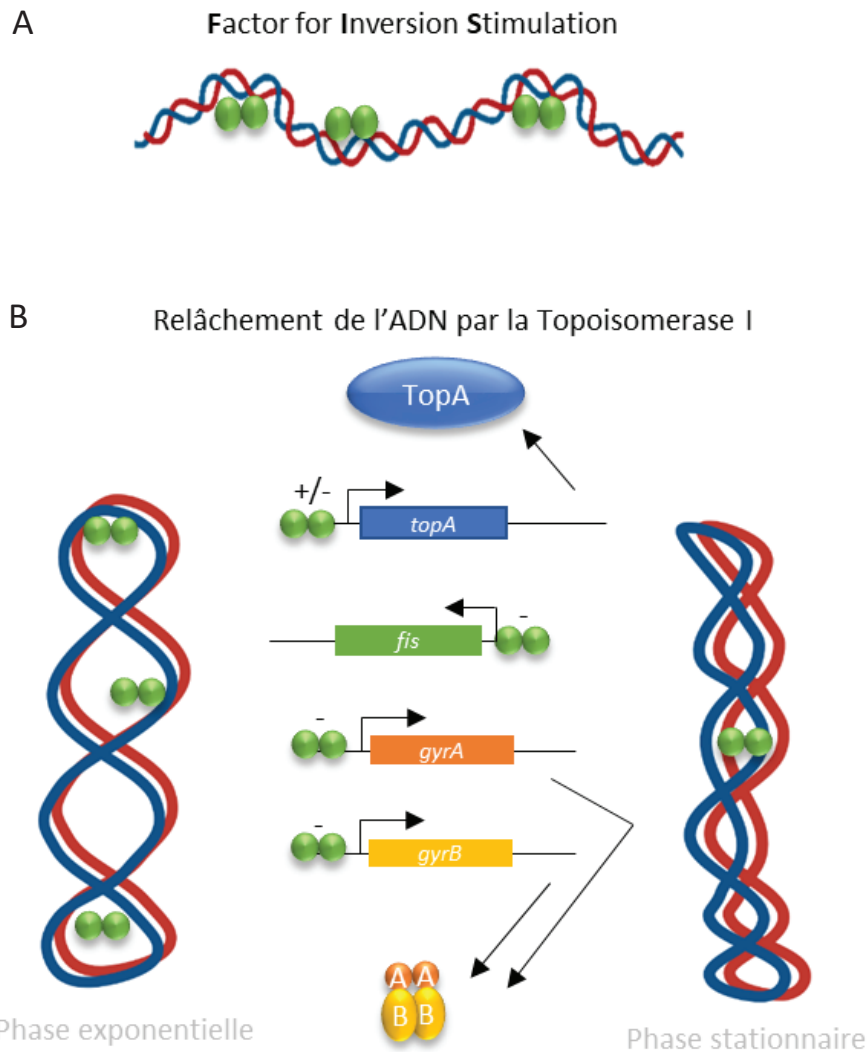


Figure 10 : H-NS. La protéine H-NS est composée d'un domaine de fixation à l'ADN (en vert) et d'un domaine de multimérisation (en rouge) (A). La fixation d'H-NS en configuration parallèle ou anti-parallèle permet la formation et la stabilisation des filaments (B). H-NS peut rigidifier l'ADN ou former des ponts en fonction de sa fixation.

b. FIS (factor for inversion stimulation) est active sous forme de dimère (figure 11). Cette NAP a initialement été caractérisée comme un stimulateur de la recombinaison spécifique de l'ADN. FIS est un activateur transcriptionnel de gènes et d'opérons associés au métabolisme primaire, y compris ceux qui codent pour les enzymes anabolique et les ARN stables (Ross et al., 1990) et est un répresseur des gènes non essentiels durant la phase exponentielle de croissance. Elle se fixe sur les séquences riches en AT de l'ADN et entraîne des courbures de 50 à 90°. Une fonction majeure de la protéine FIS semble être d'activer les gènes du métabolisme primaire et de réprimer l'expression de gènes non essentiels lors de la phase exponentielle de croissance (Browning et al., 2010).

FIS est également nécessaire pour la réplication de l'ADN à partir de *oriC* et influence l'état topologique de l'ADN dans la cellule en réprimant l'ADN gyrase et en stimulant l'expression du gène de la topoisomérase I (Schneider et al., 1999; Weinstein-Fischer et al., 2000). FIS peut également influencer la topologie de l'ADN directement en se liant à l'ADN. En particulier, il agit pour préserver les formes de superhélicité intermédiaires de l'ADN, les protégeant contre les déplacements extrêmes (Schneider et al., 1997). FIS est donc considéré comme un homéostat topologique local (Travers and Muskhelishvili, 2005). Le niveau de FIS dans la cellule est soumis à un contrôle complexe et multifactoriel. FIS est impliqué dans la régulation de l'expression des gènes de virulence dans les souches pathogènes d'*E. coli* (Goldberg et al., 2001), de *Shigella flexneri* (Falconi et al., 2001), de *Salmonella* (O Cróinín et al., 2006; Schechter et al., 2003), de *Vibrio cholera* (Lenz and Bassler, 2007) et de *D. dadantii* (Lautier and Nasser, 2007). Il a été montré que FIS aide à maintenir l'homéostasie du superenroulement en limitant le superenroulement négatif et positif par des interactions avec les topoisomérases et en régulant la transcription des gènes sensibles au superenroulement (figure 11 B).



Surenroulement de l'ADN l'ADN gyrase

Figure 11 : FIS. La protéine FIS est active sous forme de dimère. Elle influence le surenroulement global de l'ADN directement ou indirectement en régulant l'expression des gènes codant les ADN topoisomérases, elle réprime l'expression des gènes *gyrA* et *gyrB* et, à une forte concentration (phase exponentielle de croissance), celle du gène *topA*, tandis qu'elle l'active à une faible concentration (phase stationnaire de croissance). FIS réprime l'expression de son propre gène.

c. HU (heat-stable DNA-binding protein) est constitué de deux sous unités homologues Hup α et Hup β et existe sous forme d'homodimère (Hup α -Hup α ou Hup β -Hup β) ou d'hétérodimère (Hup α -Hup β) cependant la forme majoritaire est l'hétérodimère. HU se lie de manière préférentielle aux régions déformées de l'ADN, comme les coudes (Dillon and Dorman, 2010). Et contribue à la compaction du nucléoïde en courbant ou en enveloppant l'ADN (Berger et al., 2010; Remesh et al., 2020). HU influence l'expression d'un large éventail de gènes chez *E. coli*, y compris ceux impliqués dans le métabolisme central et la respiration (Dillon and

Dorman, 2010), (figure 12). HU stabilise la formation de boucles toroïdales qui sont plus facilement accessibles à la machinerie de transcription contrairement à H-NS qui stabilise la formation de plectonèmes résistants à la transcription (Oberto et al., 2009). Ainsi la disponibilité de l'ADN transcriptionnellement actif va dépendre de la compétition entre HU et H-NS pour la liaison à différentes régions du chromosome. Par conséquent, la capacité de H-NS à réprimer la transcription de certains gènes est augmentée chez les mutants *hupA-hupB* alors que la surproduction de HU permet la levée de la répression exercée par H-NS au niveau de ces mêmes gènes (Dame and Goosen, 2002). Il a également été démontré que HU régule l'architecture du nucléoïde pendant les phases de croissance bactérienne et dans des conditions de stress via des changements de conformation du nucléoïde (Remesh et al., 2020). Ces changements dans l'architecture du nucléoïde sont associés à des changements dans les programmes d'expression des gènes, probablement via la contrainte de superenroulement de l'ADN, qui est censé synchroniser les réponses génétiques dans les différentes conditions (Remesh et al., 2020).

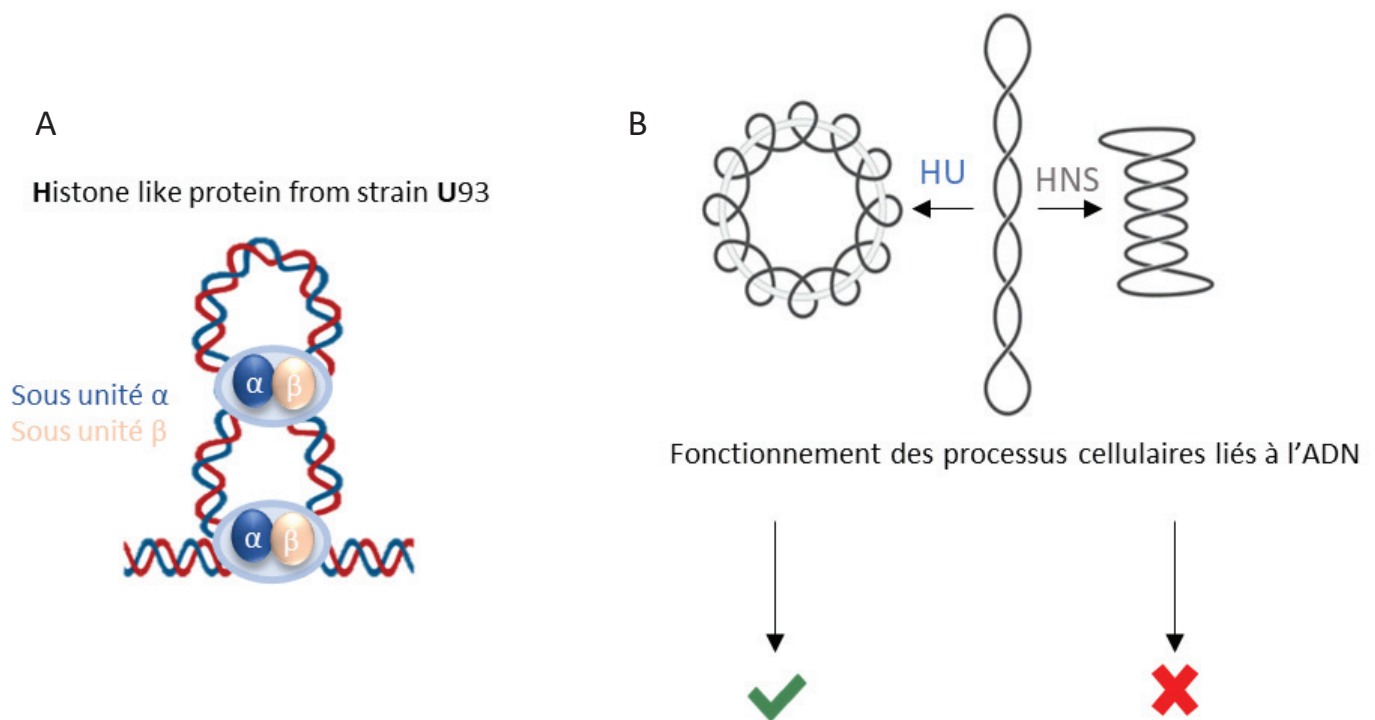


Figure 12 : HU. Le protéine HU est formé de deux sous unités Hup α et Hup β formant des hétérodimères (A). Les protéines HU et H-NS ont des effets antagonistes sur la topologie de l'ADN (d'après Maurer et al., 2009). HU stabilise la formation de boucles toroïdales qui sont favorables à la transcription contrairement aux plectonèmes dont la formation est stabilisée par H-NS (B).

d.IHF (integration host factor) est une protéine hétérodimérique composée des sous-unités IHF α et IHF β , respectivement codées par les gènes *ihfA* et *ihfB* (figure 13). IHF affecte également l'initiation de la réplication chromosomique et la transposition de l'ADN. Par conséquent, IHF joue un rôle à la fois dans la structuration des nucléoïdes et dans le réarrangement de l'ADN. Lors de leur liaison, les molécules d'IHF courbent l'ADN jusqu'à 180° et favorisent ainsi les interactions à longue distance. L'influence de IHF sur la structure locale de l'ADN contribue à la régulation de nombreux gènes (Reverchon et al., 2021). Dans certains cas, il est démontré que l'activité de courbure de l'ADN par IHF favorise la formation de complexes ouverts en facilitant la transmission de la torsion de l'ADN des régions d'ADN riches en AT en amont vers le promoteur (Sheridan et al., 1998). En outre, IHF est identifié comme un régulateur des fonctions de virulence chez diverses bactéries pathogènes, notamment *Brucella abortus*, *Shigella flexneri*, *Salmonella enterica*, *E. coli* enteropathogène et entérohémorragique, *V. cholerae* et *D. dadantii* (Mangan et al., 2006; Reverchon et al., 2021; Stonehouse et al., 2008).

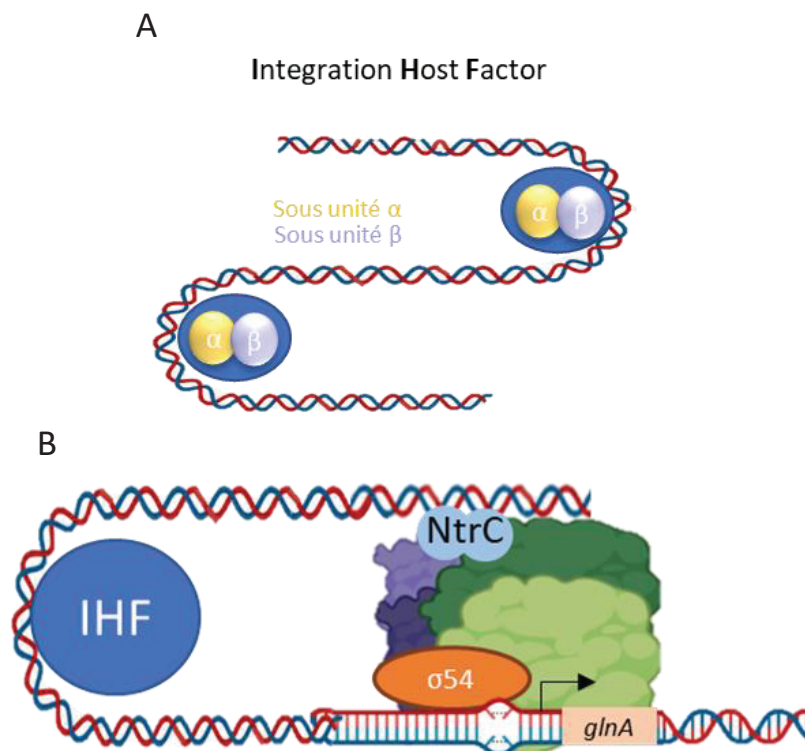


Figure 13 : IHF. La protéine IHF est composée de deux sous-unités *ihfA* et *ihfB* s'organisant en hétérodimère. IHF induit un effet de la courbure de l'ADN et sur l'activation du promoteur du gène *glnA* de *Escherichia coli* (adapté de la source (Lilja et al., 2004)). Le gène *glnA* appartient à l'opéron *glnALG* qui code la glutamine synthétase et les protéines régulatrices NRII et NRI. Le facteur $\sigma 54$ n'est pas capable d'ouvrir l'ADN pour initier la transcription. Cela nécessite l'activateur NtrC qui grâce à son activité ATPase fournit l'énergie pour ouvrir l'ADN au niveau du promoteur.

e. LRP (leucine responsive regulatory protein) est une protéine qui se cristallise sous la forme d'un octamère assemblé sous la forme d'un tétramère de dimères (figure 14). Le monomère de LRP comporte un domaine N-terminal avec un motif de liaison à l'ADN de type hélice-tour-hélice et un domaine de fixation des acides aminés localisé dans la partie C-terminale (figure 14). LRP influence la transcription de plus de 10% du génome d'E.coli (Dillon and Dorman, 2010; Kroner et al., 2019; Tani et al., 2002). L'activité de LRP peut être modulée par la leucine en fonction des gènes. La régulation de LRP comprend des gènes impliqués dans le métabolisme des acides aminés ou l'absorption des nutriments et intervient dans la régulation en activant des gènes de biosynthèse et en réprimant des gènes de catabolisme. LRP se fixe de manière coopérative pour générer des structures nucléoprotéiques complexes dans lequel l'ADN est enroulé autour de la forme octamérique de LRP. Elle module la virulence bactérienne en régulant les gènes impliqués dans l'expression des pili et l'adhésine chez E.coli et Salmonella (Corcoran and Dorman, 2009; Engstrom and Mobley, 2016), ainsi que l'activation des gènes LEE chez Citrobacter (Foer et al., 2017). Sur l'ADN lié LRP peut stabiliser les supertours positifs.

Leucine responsive Regulatory Protein

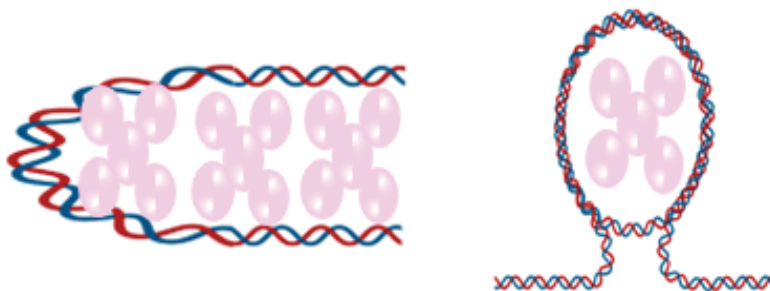


Figure 14 : LRP. La protéine LRP forme des tétramères de dimère capable de se fixer à l'ADN et ainsi de former des boucles.

Ainsi, les NAPs utilisent divers mécanismes pour adapter la demande métabolique et les processus d'adaptation dans des environnements changeants. Elles agissent de manière concertée et se régulent entre elles. Ainsi, la protéine FIS est impliquée dans le contrôle de l'expression du gène *hns* alors que H-NS réprime l'expression de son propre gène et de celui de FIS (Falconi et al., 2001). La complexité de ces interactions reste pour le moment mal

comprise, en particulier les variations de composition en NAPs lorsque l'une d'entre elles est absente et les phénomènes de compensations qui en résultent. L'existence d'un réseau de régulation entre les NAPs devrait assurer à la bactérie un contrôle plus fin de l'ensemble de ses gènes. L'optimisation de la réponse adaptative implique des effets de liaison coopératifs de diverses NAPs stabilisant des structures de superenroulement distinctes et des interactions dans le génome favorisant l'expression des gènes requis (Dame et al., 2020; Hołowka and Zakrzewska-Czerwińska, 2020; Maurer et al., 2009; Prieto et al., 2012). Ainsi, chez la bactérie pathogène humaine, *Salmonella enterica*, et chez la bactérie phytopathogène, *D.dadantii*, les NAPs et le niveau d'enroulement de l'ADN coopèrent pour coordonner l'expression des gènes de virulence et d'acclimatation pendant les différentes étapes du processus infectieux (Cameron et al., 2011; Jiang et al., 2015; Ouafa et al., 2012; Reverchon et al., 2021).

Un autre aspect important conditionnant le rôle des protéines associées au nucléoïde dans la structuration du chromosome bactérien et, par conséquent, dans la régulation de l'expression génique réside dans la variabilité de leur concentration cellulaire. L'expression des gènes codant les protéines associées au nucléoïde est intimement liée à la croissance bactérienne. Alors que FIS est présent de manière abondante au début de la phase exponentielle de croissance et devient indétectable durant la phase stationnaire, la quantité cellulaire de la forme hétérodimérique IHF augmente à l'entrée de la phase stationnaire de croissance. La concentration cellulaire de H-NS est, quant à elle, maintenue à un niveau plus ou moins constant au cours de la croissance bactérienne (Free and Dorman, 1995; Schröder and Wagner, 2002). La situation avec HU est plus complexe dans la mesure où la composition de ses deux sous-unités varie avec la croissance bactérienne. Cependant, la concentration cellulaire de HU diminue globalement au cours de la phase stationnaire de croissance (Balandina et al., 2001). Cette variabilité de la concentration cellulaire des différentes NAPs introduit une dynamique dans leur liaison au chromosome, et permet une modulation de l'expression des gènes (figure 15).

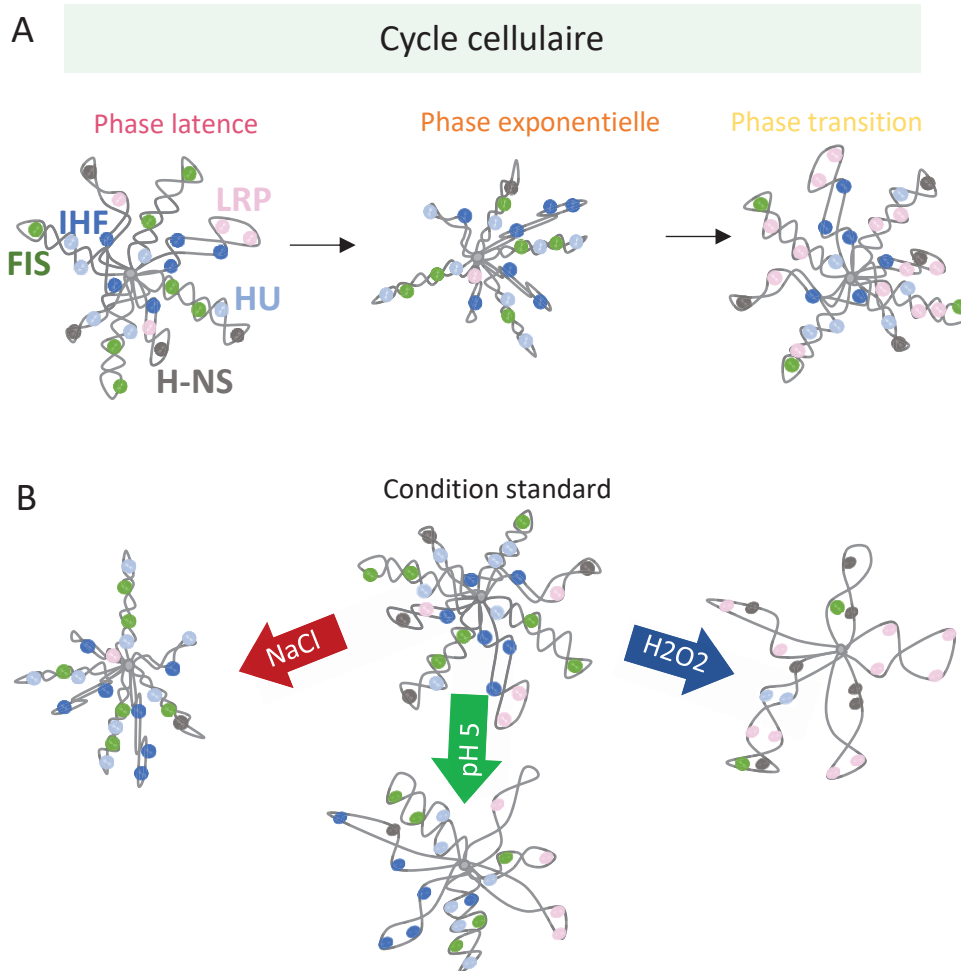


Figure 15 : Actions des protéines NAPs. Les protéines NAPs ont des actions différentes sur le chromosome (A) : H-NS forme des ponts entre deux hélices d'ADN empêchant l'avancée de l'ARN polymérase ou polymérisation à partir d'un site de nucléation sur l'ADN en formant ainsi des segments d'ADN rigide ; HU possède deux sous-unités et crée des structures en boucles dans l'ADN ; HU possède deux sous-unités et crée des structures en boucles dans l'ADN ; FIS et IHF fonctionnent en dimère et créent des courbures dans l'ADN, la courbure induite par FIS est de l'ordre de 70° alors que celle induite par IHF sont de 180° . La liaison des protéines NAPs sur l'ADN est dépendante du cycle cellulaire (B) mais également des conditions environnementales (C). HNS est un senseur des conditions environnementales et perd son affinité pour l'ADN à forte concentration en sel, à pH acide et à température élevée.

d. L'organisation en domaines du chromosome

L'organisation de la structure du nucléoïde bactérien est un compromis entre les exigences de compaction spectaculaire (environ mille fois) de l'ADN et l'accessibilité du matériel génétique aux enzymes assurant des fonctions vitales telles que la réplication, la transcription et la réparation. Des études récentes ont démontré que les chromosomes bactériens sont non seulement hautement compactés mais aussi spatialement organisés avec des loci génétiques distincts occupant des positions spécifiques dans la cellule (Dame et al., 2020; Krogh et al., 2018; Umbarger et al., 2011; Wiggins et al., 2010), (figure 16).

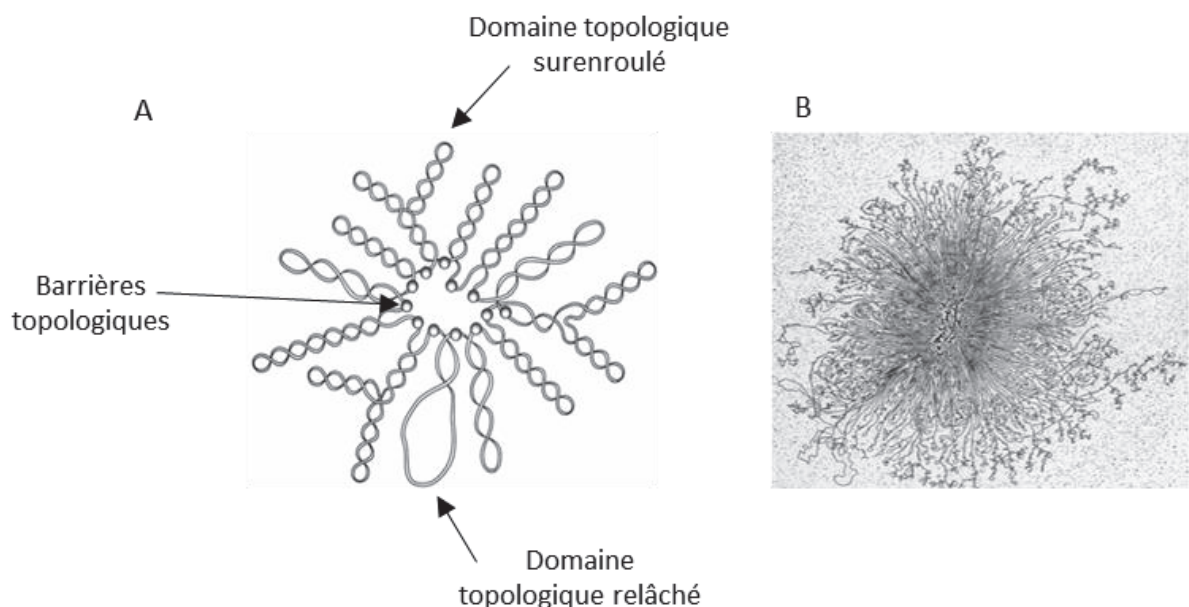


Figure 16 : Organisation du chromosome bactérien. Il s'agit d'une représentation schématique du chromosome d'*Escherichia coli*, l'organisation du chromosome en domaines topologiques surenroulés négativement et indépendants contribue de manière significative à sa compaction (adapté de la source (Johnson et al., 2005). Micrographie électronique du nucléoïde d'*Escherichia coli* (source (Kavenoff and Bowen, 1976). Le nucléoïde présente de multiples boucles d'ADN surenroulées et individuelles émanant d'une région centrale (Delius and Worcel, 1974; Kavenoff and Ryder, 1976).

Parallèlement à cette caractéristique organisationnelle, l'ordre des gènes le long de l'axe origine de réplication chromosomique - terminus (OriC - Ter) est très conservé chez les bactéries (Sobetzko et al., 2012). L'ordre des gènes est très pertinent puisque des observations récentes suggèrent une diffusion limitée des ARNm depuis leur site de production et un couplage physique étroit de la traduction au site de transcription dans le nucléoïde (Kuhlman

and Cox, 2012; Montero Llopis et al., 2010). Chez *E. coli*, il a été démontré que la compaction des chromosomes est variable au cours de la croissance. Par exemple, pendant la croissance exponentielle rapide, le chromosome est condensé avec de l'ARN polymérase (RNAP) principalement localisée à quelques loci hautement actifs tels que ceux contenant des gènes codant pour les ARN stables (Cabrera et al., 2009; Lesterlin et al., 2012; Remesh et al., 2020); par contre, à l'entrée de la phase stationnaire de croissance, le chromosome se décondense avec une distribution de molécules RNAP sur toute sa surface (figure 17).

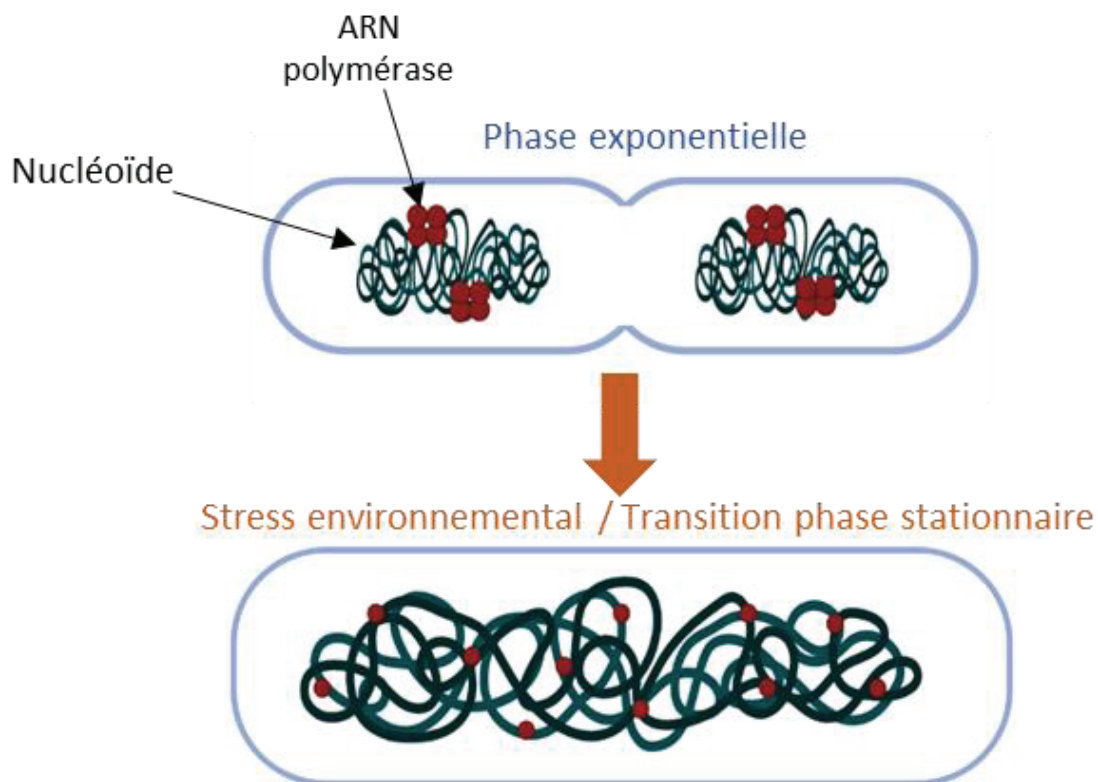


Figure 17 : Localisation de l'ARN polymérase en fonction de la phase de croissance et en condition de stress. Le niveau de condensation du nucléoïde varie en fonction des phases de croissance, cela est dû à une répartition différente des NAPs. En phase exponentielle H-NS, FIS et HU sont les plus abondantes alors qu'en phase stationnaire IHF est présente et Dps condense l'ADN.

Ainsi il apparaît que les différents niveaux d'organisation de l'ADN jouent des rôles dans la régulation transcriptionnelle et que de manière concomitante la transcription affecte l'organisation des chromosomes (Shen and Landick, 2019; Weng et al., 2019; Zhang and Landick, 2016). En outre, les changements dans la configuration du chromosome ou de régions chromosomiques particulières sont apparus comme une stratégie d'adaptation efficace en réponse à des conditions défavorables soudaines (Dame et al., 2020; Hołowka and

Zakrzewska-Czerwińska, 2020). L'organisation de cette structure nucléoïde hiérarchique et dynamique résulte de l'action de divers facteurs, principalement l'encombrement moléculaire, le super enroulement de l'ADN, les protéines associées aux nucléoïdes (NAP) et la transcription (Dillon and Dorman, 2010; Dorman, 2014; Krogh et al., 2018; Shen and Landick, 2019). Parmi ces facteurs, les NAPs et le superenroulement généré par la transcription ont mérité plus d'attention au cours des dernières années.

L'essentiel des processus cellulaires impliquant l'ADN nécessite le clivage d'un ou des deux brins de la double hélice, ce qui est susceptible d'affecter le degré de surenroulement global de l'ADN. Chez *Escherichia coli*, une réduction, même modeste, du surenroulement négatif étant létale (Wang and Lai, 1995; Zechiedrich et al., 1997), le maintien de l'intégrité structurale du chromosome bactérien demeure primordial. Celui-ci est organisé en domaines topologiques surenroulés négativement et indépendants (Worcel and Burgi, 1972). La taille moyenne de ces domaines coïncide avec la longueur moyenne des boucles d'ADN observées par microscopie électronique (Postow et al., 2004; Travers and Muskhelishvili, 2005) suggérant que ces boucles correspondent aux domaines topologiques du chromosome bactérien. Des études récentes à haut débit, réalisées principalement chez *E. coli* et des bactéries apparentées, ont permis de préciser l'organisation du nucléoïde en domaine. Les domaines de transcription cohérents s'étendant sur des régions chromosomiques de plusieurs kilobases à plusieurs centaines de kilobases. Divers facteurs sont impliqués dans la structuration de ces domaines d'expression chromosomique, dont les principaux sont : des unités de transcription fortes (Booker et al., 2010; Lee et al., 2013), des interactions régulatrices (Fritsche et al., 2012), des effets de liaison des NAPs et d'autres protéines structurant l'ADN (Dame et al., 2011; Lioy and Boccard, 2018; Scolari et al., 2011), les ADN topoisomérases (Krogh et al., 2018; Meyer et al., 2018), et l'organisation particulière de la séquence des régions chromosomiques (Ferrándiz et al., 2010; Jiang et al., 2015; Muskhelishvili et al., 2019; Sobetzko et al., 2013). Aux plus courtes échelles de longueur, le nucléoïde est organisé en domaines superenroulés (SD) qui sont topologiquement isolés les uns des autres (~10kb de taille). En effet, les SDs ont été initialement définis comme des segments d'ADN chromosomique relâchés par l'introduction de cassures simples ou double brins (Higgins, 2014; Postow et al., 2004). À plus grande échelle, la capture de la conformation des chromosomes et les technologies associées (telles que les approches 3C-génomique et Hi-

C) ont révélé l'existence de domaines d'interaction chromosomique (CID), des régions présentant des fréquences élevées d'interactions. Une relation proportionnelle entre le niveau de transcription des gènes spatialement proches et leurs fréquences de contact a été récemment suggérée chez *E. coli* et *Bacillus subtilis* (Dugar et al., 2022; Lioy and Boccard, 2018). Cela suggère que les gènes hautement transcrits sont organisés de telle sorte qu'ils interagissent plus souvent. Des CID ont été identifiés chez différentes bactéries dont *Caulobacter crescentus*, *B. subtilis* et *Mycobacterium pneumoniae* ; leur taille varie de 30 à 400 kb et ils présentent une variabilité importante dans la netteté de leurs frontières, ce qui suggère que différentes cellules pourraient avoir des frontières de domaines différentes, certainement transitoires. L'ADN génomique à l'intérieur de chaque CID semble être organisé en boucles plectonémiques super enroulées d'au moins 10 kb de long (figure 18).

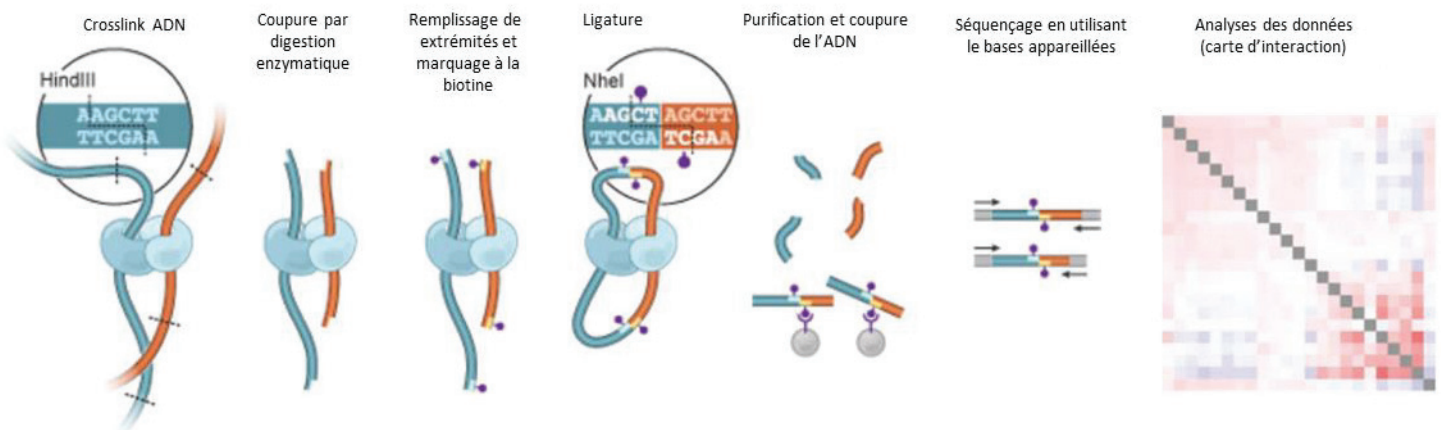


Figure 18 : Principe de l'approche HI-C (adapté de la source (van Berkum et al., 2010)). L'ADN cellulaire est ponté avec du formaldéhyde ce qui permet la formation de liaison covalente entre les régions de l'ADN spatialement éloignées. La chromatine est digérée par digestion enzymatique et les extrémités obtenues sont remplis avec des nucléotides biotinylés. Un fois la ligature effectuée, l'ADN est purifié et fragmenté, les jonctions biotinylés sont isolées et les fragments sont séquencés et analysés afin de dessiner des cartes d'interaction.

Les frontières entre les CIDs sont fréquemment créées par des gènes longs et hautement transcrits, même si tous les gènes fortement transcrits ne sont pas associés à des frontières (Lioy et al., 2021). Les mécanismes moléculaires de la formation des frontières restent donc encore peu clairs. Le modèle actuel propose que la transcription entraîne une décompaction locale de l'ADN chromosomique qui diminue les contacts entre domaines voisins, formant ainsi les frontières de domaines. Cette affirmation est soutenue par le fait que l'inhibition de l'initiation de la transcription par la rifampicine entraîne une perte

spectaculaire des frontières des CID (Lioy and Boccard, 2018; Marbouty and Koszul, 2015; Trussart et al., 2017).

Les travaux réalisés chez *Mycoplasma*, une bactérie au génome réduit, ont postulé que les gènes d'un même domaine ont tendance à être co-régulés, ce qui suggère que l'organisation chromosomique influence la régulation transcriptionnelle (Trussart et al., 2017). Cependant, aucune preuve directe soutenant cette hypothèse n'a été fournie et les relations de causalité entre ces corrélations n'ont pas été élucidées. Des études sur l'architecture des génomes d'*E. coli* et de *B. subtilis* ont mis en évidence le rôle des NAPs dans la conformation du chromosome (Dugar et al., 2022; Lioy and Boccard, 2018). Chez *E. coli*, HU et FIS favorisent les contacts à longue portée tandis que H-NS réduit les interactions à courte portée en cohérence avec la fonction de répresseur de l'expression génétique de cette dernière NAP. En effet, les interactions chromosomiques à courte portée sont souvent en corrélation avec l'expression génétique chez les bactéries (Lioy and Boccard, 2018). Les mécanismes sous-jacents sont cependant inconnus. Ces NAPs peuvent également soit contraindre le superenroulement à l'intérieur des CIDs ou SDs pour soulager la contrainte de torsion et stabiliser les domaines, soit créer des pontages entre les domaines et ainsi former un CID plus grand avec des SDs imbriqués (Shen and Landick, 2019), (figure 19).

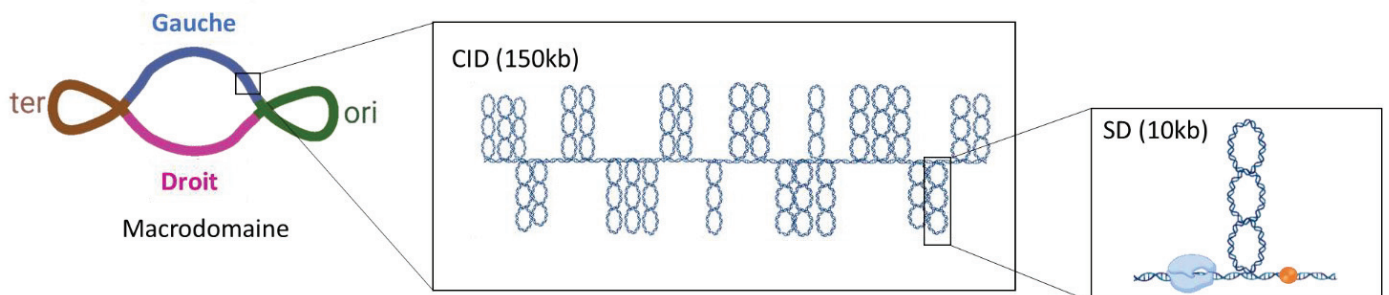


Figure 19 : Schéma intégratif de l'organisation du chromosome. Chez *E. coli* le chromosome est organisé en quatre macrodomaines ayant des interactions : l'origine de réplication, le macrodomaine droit, le terminus de réplication et le macrodomaine gauche. Ces macrodomaines contiennent de régions d'interactions plus importante nommée CID d'une taille moyenne de 150kb et des zones de surenroulement isolés nommés SD de taille moyenne de 10kb.

De manière intéressante, chez *B. subtilis* que la protéine ROK, apparentée à H-NS, forme de grands complexes nucléoprotéiques qui interagissent de manière robuste les uns

avec les autres sur de grandes distances pour former de larges boucles chromosomiques (figure 20).

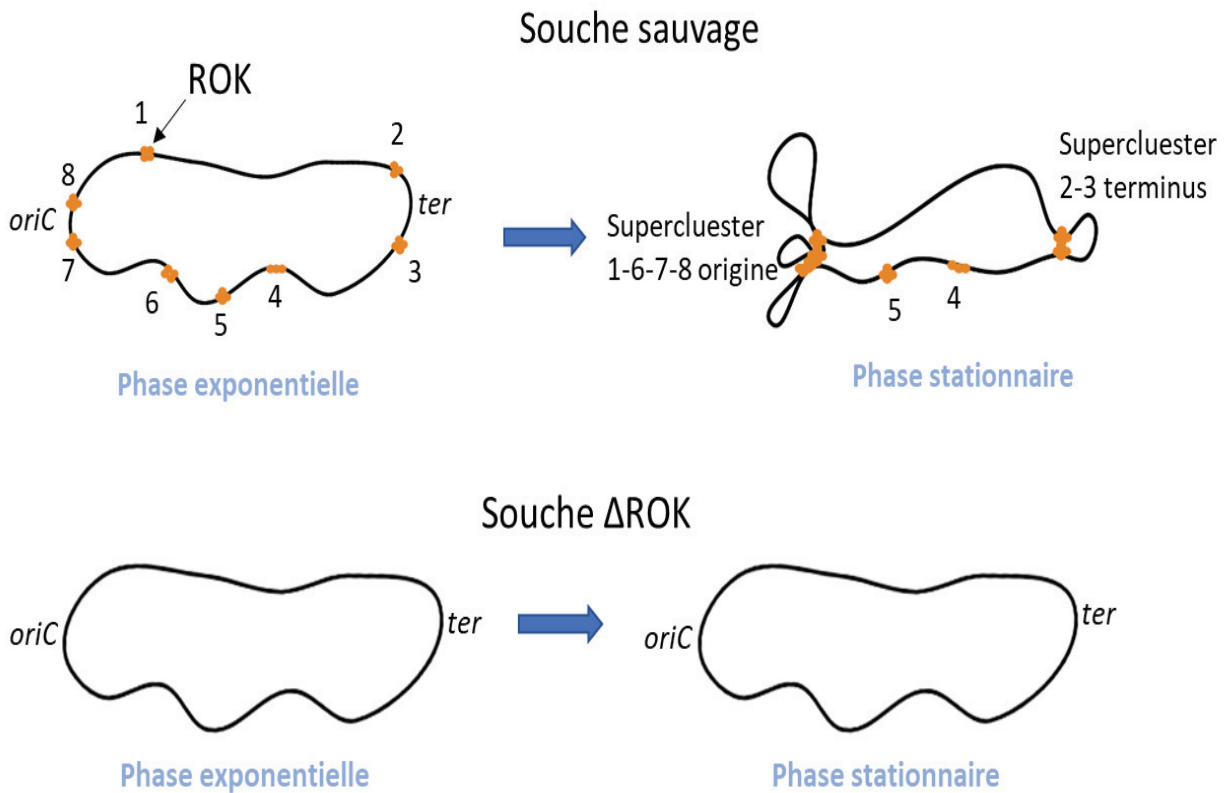


Figure 20 : Impact de la protéine associée au nucléoïde ROK de *Bacillus subtilis* sur la formation des superboucles. Schéma adapté de la source (Dugar et al., 2022) via la méthode du Hi-C les interactions entre les CIDs sont observé chez *Bacillus subtilis*. Les auteurs observent que le facteur de transcription ROK permet la formation de complexe nucléoprotéique et l'interaction entre régions éloignées sur le chromosome. L'interaction entre ces régions distantes disparaît dans un mutant Δ ROK.

Bien que la formation de ces boucles ait un impact sur la dynamique des CIDs, leur signification reste à élucider (Dugar et al., 2022). En outre, comme il a été observé pour H-NS chez *E. coli*, ROK restreint les interactions à courte portée. À une échelle supérieure, les chromosomes sont organisés en macro-domaines documentés pour la première fois chez *E. coli* (Cagliero et al., 2013; Espeli et al., 2008). Ces domaines sont les domaines d'origine, droit, terminus et gauche ; deux domaines supplémentaires non structurés, nommés domaines non structurés droit et gauche, sont situés entre l'origine et les régions flanquantes de part et d'autre, respectivement. Le chromosome d'*E. coli* est divisé en quatre macrodomaines (ori, right, left et ter) et en deux régions non structurées (nommées NR-R et NR-L). Les

macrodomaines font environ 1kb chacun. Les connexions entre les macrodomaines, les CIDs et les SDs et la transcription restent à élucider. Dans l'ensemble, il semble que la transcription et la structuration de la chromatine influencent la formation des domaines mais des investigations supplémentaires sont nécessaires pour élucider les bases des interactions entre ces deux paramètres. Il est nécessaire d'utiliser plus de modèles bactériens et d'élargir les conditions d'investigation en évaluant, par exemple, l'impact de facteurs agissant sur la structuration du chromosome dans des conditions de forte et de faible activité de transcription.

D'autres études ont mis en évidence l'importance de la diffusion du superenroulement couplée à la transcription et la formation de ce que l'on appelle les domaines cohérents d'expression (CODO) qui s'étendent sur des régions chromosomiques de plusieurs dizaines à plusieurs centaines de kilobases (Jiang et al., 2015; Reverchon et al., 2021). Parmi les facteurs impliqués dans la formation de ces domaines, il y a les effets de liaison des NAPs, les interactions régulatrices et aussi l'organisation des loci chromosomiques. Les caractéristiques de ces domaines cohérents d'expression ressemblent à ceux des îlots de pathogénicité abondamment décrits dans lesquels les gènes regroupés semblent être activés ou réprimés en fonction de l'organisation spatiale, de la diffusion du superenroulement et de la dynamique structurale régionale de l'ADN qui sont directement corrélés à l'organisation des séquences du génome. Ces domaines chromosomiques ont été identifiés sur la base de propriétés physiques des séquences génétiques exprimées, telles que leur comportement dynamique (niveau de superenroulement), leur stabilité thermodynamique (énergie de fusion négative moyenne) et l'orientation spatiale des gènes dans le génome (biais de brin avancé/retardé). Ces domaines ont été particulièrement étudiés chez la bactérie modèle commensale *E. coli* et chez la bactérie phytopathogène *D. dadantii*. Il a été constaté que chez *E. coli*, cette organisation favorise une expression temporelle des gènes requis pour la croissance le long de l'axe origine-terminus. Ainsi, les gènes requis pour une croissance rapide et nécessitant un niveau élevé de superenroulement négatif de l'ADN pour une expression optimale sont situés à proximité de l'origine, tandis que ceux relativement moins dépendants du super enroulement négatif de l'ADN et requis dans des conditions moins favorables pour la croissance sont plus proches du terminus. Chez *Dickeya*, une organisation plus complexe du génome est observée avec l'existence de domaines d'expression chromosomiques étendus

comportant des séquences d'ADN thermodynamiquement distinctes au sein desquelles les gènes répondent de manière cohérente aux différents stress rencontrés lors de l'infection (Jiang et al., 2015; Muskhelishvili et al., 2019). Ces domaines de *D. dadantii* se forment de manière transitoire en réponse aux stress environnementaux, ce qui a permis d'identifier des couplages uniques entre les propriétés dynamiques et physicochimiques des séquences exprimées, leur contenu fonctionnel et les impacts spécifiques des NAPs H-NS, FIS et IHF. L'inactivation de ces trois NAPs entraîne une réorganisation de l'expression génomique conduisant à une modification de l'expression de nombreux gènes de virulence et du pouvoir pathogène de *D. dadantii* (Jiang et al., 2015; Lautier and Nasser, 2007; Nasser et al., 2001; Reverchon et al., 2021), (figure 21).

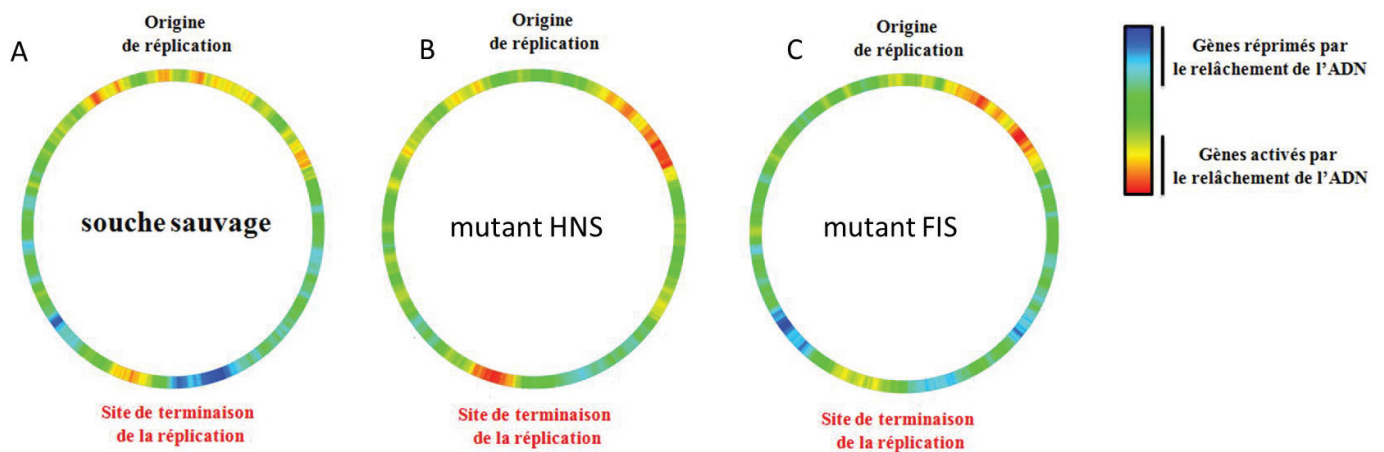


Figure 21 : Densitométrie des gènes dont l'expression est modulée par la topologie de l'ADN sur le chromosome bactérien. L'expression est observée dans la souche sauvage (A), le mutant H-NS (B) et dans le mutant FIS de *D. dadantii* (C). Les régions bleues correspondent aux régions présentant une forte densité de gènes réprimés par le relâchement de l'ADN. Les régions rouges correspondent aux régions présentant une forte densité de gènes stimulés par le relâchement de l'ADN.

D) La dynamique du chromosome comme acteur de la régulation

a. Encombrement macromoléculaire cytoplasmique

Chez les bactéries, le chromosome est en contact direct avec les nombreuses macromolécules (protéines et ARN) présentes dans le cytoplasme. La concentration de ces macromolécules est très élevée de l'ordre de 300 mg d'ARNs et de protéines/ml, au regard de la concentration locale du nucléoïde estimée à 50-100 mg d'ADN/ml (Murphy and Zimmerman, 1995; Zimmerman and Trach, 1991). Cet encombrement macromoléculaire cytoplasmique joue un rôle important dans la compaction du chromosome bactérien (Hall and Minton, 2003; Minton and Wilf, 1981; Minton et al., 1983; Zimmerman and Minton, 1993). En effet, les molécules d'ARNs et de protéines occupent un volume non négligeable du cytoplasme réduisant, ainsi, considérablement le volume disponible pour les autres constituants du cytoplasme bactérien, et notamment l'ADN qui est, ainsi, condensé et occupe 1/8^{ème} à 1/5^{ème} du volume intracellulaire (Valkenburg et al., 1985), (figure 22). Les mécanismes essentiels intervenant dans la compaction de l'ADN sont présentés ci-dessous.

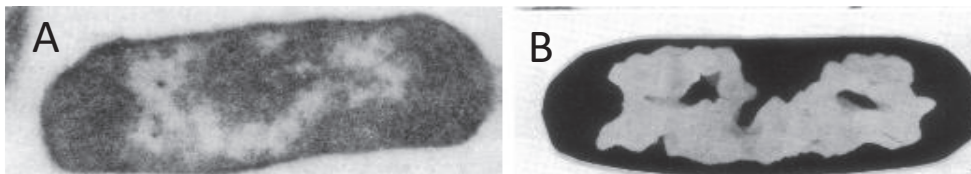


Figure 22 : Représentation de l'encombrement cytoplasmique bactérien (adapté de (Valkenburg et al., 1985). Comparaison entre l'observation en contraste de phase (A) et en microscopie en confocal (B), afin d'observer le volume occupé par l'ADN dans des cellules d'*E.coli*.

b. Variation du surenroulement en fonction des conditions

Comme précédemment illustré, le niveau de surenroulement négatif de l'ADN est lié à l'activité de l'ADN gyrase dont l'activité est intimement dépendante de la disponibilité en ATP (Snoep et al., 2002; Westerhoff et al., 1988). Cette dépendance la lie au ratio cellulaire [ATP]/[ADP] et donc, à l'état physiologique de la cellule. Ainsi, pendant la phase exponentielle de la croissance bactérienne, lorsque le rapport [ATP]/[ADP] est élevé, l'ADN est fortement

surenroulé, favorisant ainsi, l'expression des gènes dont les promoteurs sont sensibles au surenroulement négatif tels que les ARN stables, alors que pendant la phase stationnaire de croissance, le rapport [ATP]/[ADP] diminue, il en résulte un surenroulement plus faible de l'ADN (figure 23). Ce faible niveau d'enroulement réduit la synthèse des ARNs stables. Il existe de ce fait un bon couplage entre la physiologie de la cellule et la topologie de l'ADN.

Les conditions environnementales affectent également la topologie de l'ADN du nucléoïde (Dorman and Deighan, 2003). Un stress oxydant, par exemple, induit des lésions de l'ADN et provoque un relâchement global (Horiuchi et al., 1984; Weinstein-Fischer et al., 2000). Parallèlement, un nombre important de gènes doivent être exprimés rapidement pour la survie de la bactérie, ce qui provoque une accumulation locale de supertours négatifs derrière le passage de l'ARN polymérase (Rui and Tse-Dinh, 2003). Ainsi la topologie de l'ADN est profondément modifiée dès qu'un stress est rencontré par la bactérie et ceci peut avoir une répercussion globale sur l'expression de nombreux gènes. Certains pathogènes mettent à profit les variations topologiques induites par les conditions de vie rencontrées dans l'hôte pour moduler l'expression de leurs facteurs de virulence. Ainsi, chez la bactérie *Shigella flexneri*, l'expression des gènes de virulence *virF* et *virB* est thermorégulée. Cette thermorégulation est liée à une topologie particulière de la région promotrice de ces gènes et à l'intervention de protéines associées au nucléoïde qui vont moduler cette topologie en fonction de la température (Falconi et al., 1998). De même, chez *Salmonella typhimurium*, l'induction séquentielle de l'expression des gènes codant les deux systèmes de sécrétion de type III, SPI1 et SPI2, requis pour l'invasion de l'hôte et la survie dans les macrophages, respectivement, est modulée par surenroulement négatif de l'ADN (Dorman and Corcoran, 2009). Enfin la bactérie phytopathogène *D. dadantii* utilise les modulations de la topologie de l'ADN induite par les conditions de la pathogénèse pour coordonner la synthèse de ses fonctions de virulence et d'acclimatation (Jiang et al., 2015; Ouafa et al., 2012).

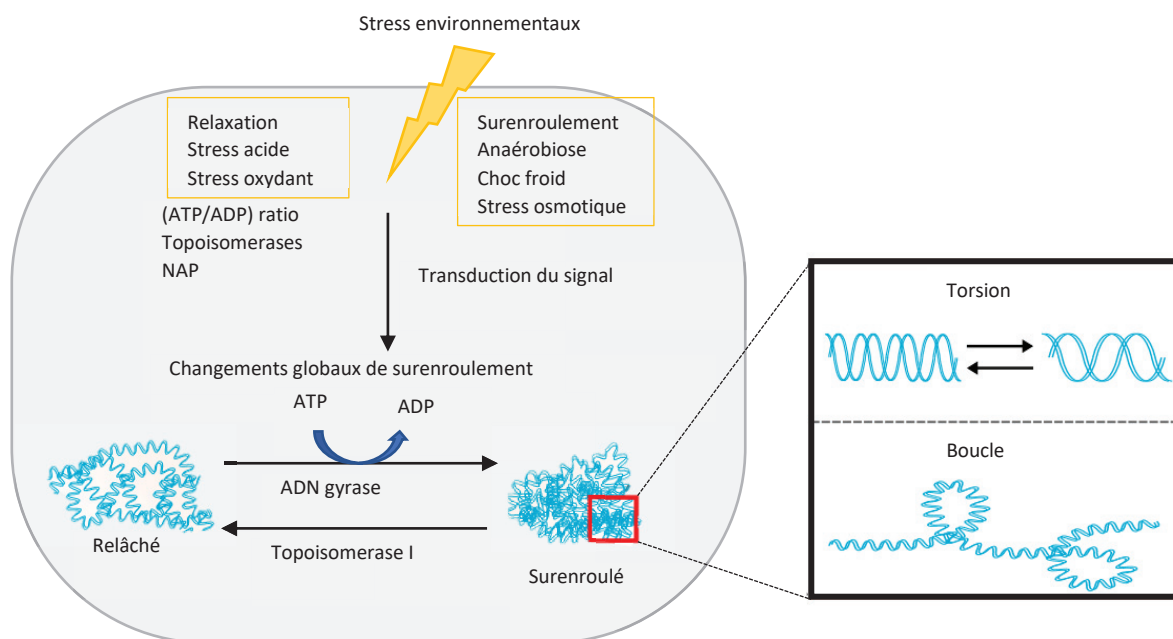


Figure 23 : Schéma représentant le niveau d'enroulement de l'ADN en fonction des disponibilités en ATP (adapté de la source Martis B et al., 2019). Le surenroulement de l'ADN agit comme un capteur de stress environnemental sur le chromosome bactérien. Les signaux environnementaux sont transduits par divers mécanismes et le surenroulement est distribué localement sous forme de boucle ou de torsion qui affectent l'activité transcriptionnelle.

c. Impact de la transcription sur la localisation subcellulaire des gènes

Comme indiqué précédemment, la transcription a un impact sur la topologie de l'ADN car l'ARNP qui transcrit introduit un superenroulement positif immédiatement en aval du complexe de transcription et un superenroulement négatif en amont de celui-ci (Ma et al., 2013), (figure 24). En outre, les gènes à superhélicité négative sont souvent transcrits plus efficacement que les gènes compacts à superhélicité positive en raison de l'exposition accrue d'une région promotrice plus lâche et du désenlacement de l'ADN dans les gènes à superhélicité négative (Shen and Landick, 2019; Sobetzko et al., 2013). Ainsi, l'ARNP en cours de transcription module l'expression des gènes voisins.

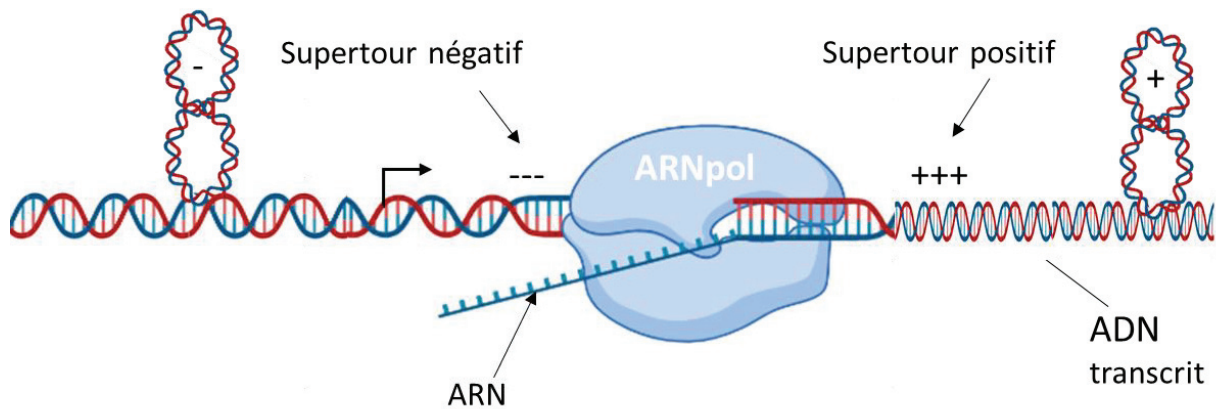


Figure 24 : Surenroulement de l'ADN médié par l'ARN polymérase. La transcription engendre des supertours positifs en aval de l'ARN polymérase et des supertours négatif en amont. La diffusion des supertours négatif derrière la polymérase facilite la dénaturation locale de l'ADN augmentant ainsi l'initiation de la transcription et inhibant la terminaison alors que les supertours positifs devant l'ARN polymérase inhibent l'initiation et augmente la terminaison.

Le lien entre la transcription et l'organisation des nucléoïdes a été exploré plus en profondeur récemment avec l'émergence d'approches de génétique moléculaire couplées à la microscopie à épifluorescence haute définition. Ainsi, il a été signalé, dans les cellules d'*E. coli* et de *B. subtilis* cultivées dans des milieux riches, que les molécules d'ARN polymérase forment des foyers denses, principalement engagés dans la transcription des ARNr en raison de la transcription accrue des gènes codant ces ARNr (Bremer et al., 2003; Cabrera et al., 2009; Jin and Cabrera, 2006; Jin et al., 2017). D'autres études ont révélé que ces foyers d'ARN polymérase sont préférentiellement enrichis à la surface de l'ADN chromosomique, ce qui a conduit à la proposition de l'hypothèse selon laquelle les régions activement transcrites devraient se situer à la périphérie du nucléoïde (Stracy et al., 2015). Une explication causale potentielle est que l'initiation de la transcription conduit à la production d'ARNm naissants, qui induit le recrutement des ribosomes. Ces grands complexes ADN-ARNP-ribosomes seraient exclus de la masse de l'ADN par entropie et auraient tendance à migrer à la périphérie du nucléoïde (Bakshi et al., 2014). L'hypothèse de la focalisation de l'ARNP a récemment été nuancée par des études plus larges qui ont révélé que l'ARNP est capable de former des clusters en présence d'un nombre limité d'opérons *rrn* ou même en l'absence de niveaux élevés de synthèse d'ARNr (Weng et al., 2019) et que l'inhibition de l'activité gyrase, impliquée dans la structuration globale du nucléoïde, entraînait une redistribution des clusters d'ARNP. Il a donc été postulé que la structure sous-jacente du nucléoïde était le principal auteur de la

distribution spatiale de l'ARN polymérase au niveau cellulaire plutôt que la transcription active (Weng et al., 2019). Ainsi, les mécanismes responsables de la distribution spatiale des ARNP dans la cellule restent controversés même si la corrélation entre transcription et localisation subcellulaire reste importante (figure 25).

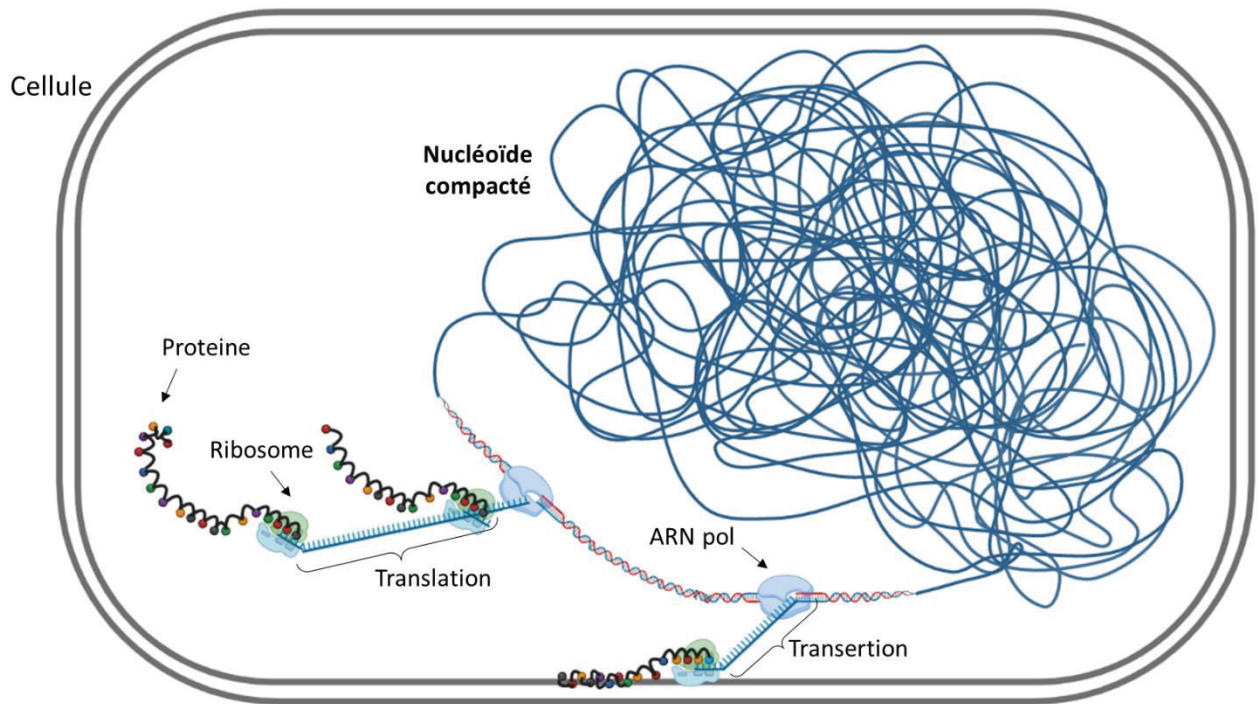


Figure 25 : Impact de la transcription sur la localisation subcellulaire des gènes. La transcription commence avec la formation du complexe ARN polymérase-promoteur. Lorsque le site de liaison ribosomique de l'ARNm est transcrit, les sous-unités du ribosome se lient à l'ARNm et ainsi se forme le complexe ADN-ARN polymérase-ARN-ribosome de taille importante ce qui force son déplacement vers la périphérie du nucléoïde. Dans le cas de certaines protéines membranaires le couplage transcription-traduction-insertion dans la membrane que l'on nomme la transertion permet leur ancrage à la membrane interne en cours de synthèse.

2) *Dickeya dadantii*, une entérobactérie phytopathogène

La régulation des facteurs de virulence est un modèle intéressant pour étudier comment les bactéries intègrent les effets de divers effecteurs, y compris les NAPs et la dynamique chromosomique, pour contrôler l'expression des gènes au niveau transcriptionnel. En effet, comme précédemment indiqué, les agents pathogènes doivent faire face à de nombreux défis spécifiques, notamment les stress acide, osmotique et oxydatif, échapper aux réactions de

défense de l'hôte, accéder à des oligo-éléments spécifiques et déclencher une attaque opportune contre l'hôte. La production de facteurs de virulence doit être étroitement coordonnée afin d'optimiser la consommation d'énergie, le développement approprié de la maladie et l'évasion du système de défense de l'hôte, pour finalement aboutir à la dispersion des bactéries. La plupart des bactéries pathogènes ont développé des systèmes sophistiqués pour détecter les environnements hostiles et déclencher l'expression de gènes nécessaire à leur survie dans l'hôte.

A) Evolution de la taxonomie du genre *Dickeya*

La classification des entérobactéries phytopathogènes a évolué au cours du temps avec le séquençage massif des souches bactériennes et l'amélioration des méthodes de classification. Initialement regroupées en un seul genre appelé *Erwinia* (Winslow et al., 1920), ces bactéries ont été par la suite différenciées en quatre groupes en se basant sur des caractéristiques de virulence : les *Erwiniae* nécrosantes, les *Erwiniae* pectinolytiques, les *Erwiniae* à pigments jaunes et les *Erwiniae* atypiques. A la fin des années 1990, des études phylogénétiques réalisées sur différentes espèces d'*Erwinia* (Hauben et al., 1998) ont conduit à l'éclatement des *Erwinia* en quatre nouveaux genres : *Erwinia* qui contient les *Erwiniae* nécrotiques ; *Pectobacterium*, qui contient les espèces à forte activité pectinolytique sur les tissus végétaux ; *Brenneria* qui rassemble des espèces responsables de bactérioses sur les plantes lignifiées ; et *Pantoea* qui contient les espèces produisant un pigment jaune. Les études réalisées ultérieurement par Samson *et al.* en 2005 (Samson et al., 2005) sur une collection de différentes souches de *pectobacterium* en associant des méthodes génotypiques et phénotypiques (comparaison des séquences du 16S, hybridation ADN-ADN et utilisation de différentes sources de carbone) ont conduit à la séparation des *pectobacterium* en deux genres distincts : les *pectobacterium* et la création du genre *Dickeya*. Six espèces apparentées à ce nouveau genre ont été différenciées à l'époque : *D. zeae* (Hugouvieux-Cotte-Pattat et al., 2019), *D. dieffenbachiae*, *D. paradisiaca* , *D. dianthicola* , *D. dadantii* et *D. chrysanthemi*. Depuis 2005 sept nouvelles espèces ont été décrites : *D. undicola* ((Oulghazi et al., 2019), *D. lacustris* (Hugouvieux-Cotte-Pattat et al., 2019), *D. poaceiphila* (Hugouvieux-Cotte-Pattat et al., 2020), *D. oryzae* (Wang et al., 2020), *D. parazeae* (Hugouvieux-Cotte-Pattat and Van

Gijsegem, 2021), *D. fangzhongdai* et *D. aquatica* (Parkinson et al., 2014). L'espèce *D. dieffenbachiae* a été intégré dans l'espèce *D. dadantii* en tant que sous espèces. Nous avons de nos jours 12 espèces de *Dickeya* distinctes (figure 26).

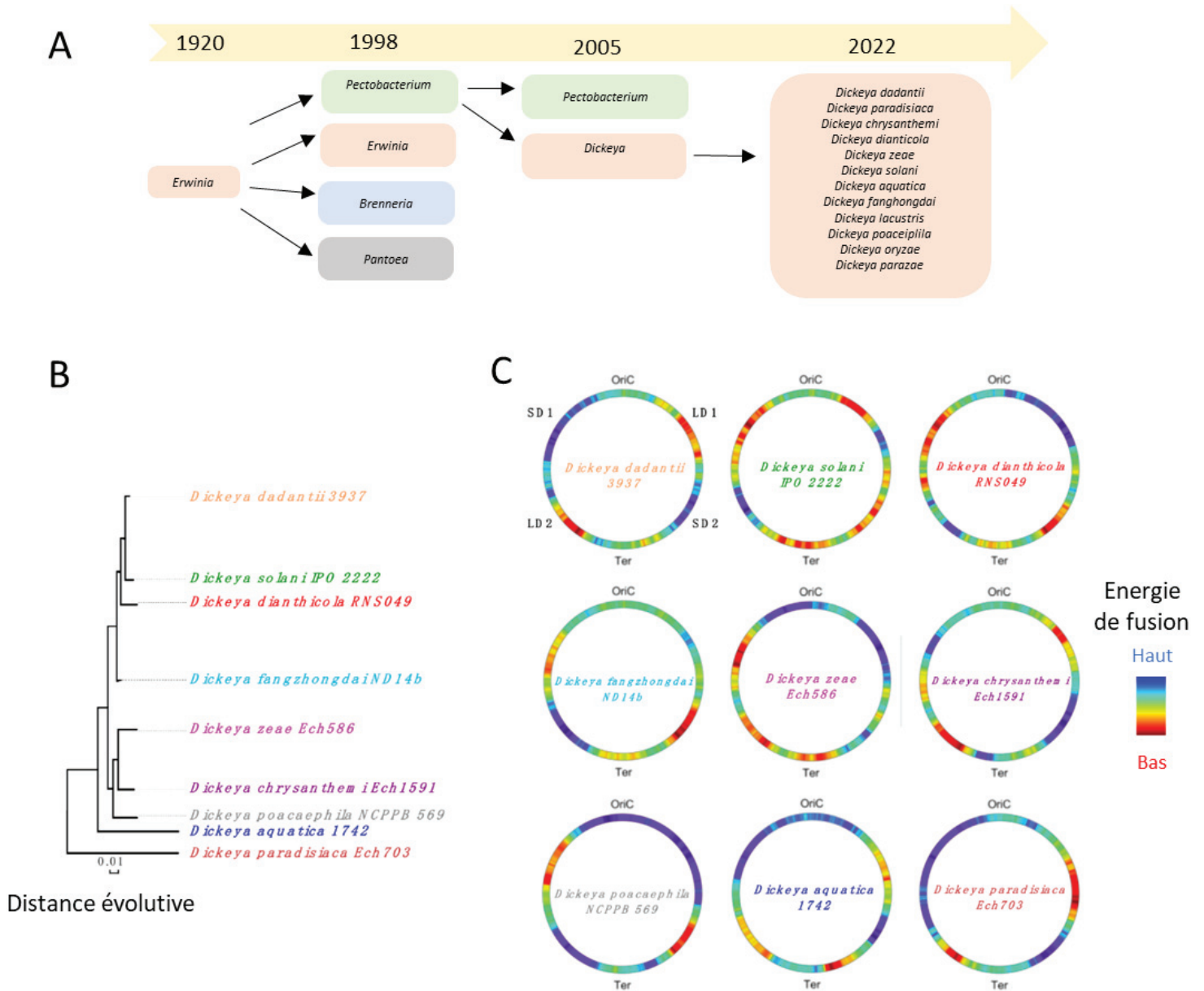


Figure 26 : Le genre *Dickeya*. La taxonomie du genre *Dickeya* à évoluer au cours du temps (A). L'arbre phylogénétique représente les distances évolutives des espèces de *Dickeya* (B). Les graphiques de densité montrent la distribution de l'énergie de fusion moyenne de l'ADN dans les génomes circulaires de *Dickeya* (adapté de la source Muskhelishvili et al., 2019). Depuis 2019, trois nouvelles espèces ont été décrites et n'apparaissent pas dans l'arbre : *D. undicola*, *D. lacustris* et *D. oryzae*.

L'évolution de la taxonomie des *Dickeya* engendre des difficultés pour établir une cartographie mondiale de chacune des espèces. Toutefois, les bactérioses liées aux *Dickeya* étaient initialement localisées dans les régions à climat tropical et humide. Depuis maintenant plus d'une dizaine d'années, ces bactéries, notamment *D. dianthicola* et *D. solani*, émergent dans les régions à climat plus tempéré comme les contrées européennes et d'Amérique du nord (Toth et al., 2011). Plusieurs hypothèses complémentaires sont avancées pour expliquer l'expansion géographique quasi-mondiale de ces bactéries. Dans un premier temps, l'augmentation des échanges commerciaux et l'exportation de semence de tubercules de pomme de terre contaminées favoriseraient l'émergence des *Dickeya* dans des habitats sains. Dans un second temps, le réchauffement climatique couplé à une forte adaptabilité de ce genre bactérien aiderait à l'implantation des espèces importées involontairement par l'homme. La persistance des *Dickeya* pourrait être favorisée par leur large spectre d'hôte mais aussi par l'absence de méthodes prophylactiques (aération des terres, désinfection des outils...). Le symptôme majeur d'une infection par les *Dickeya* est le symptôme de pourriture molle (figure 27).



Figure 27 : Symptômes d'une infection par *Dickeya* (source Reverchon et al, 2013). Les bactéries du genre *Dickeya* sont responsables des symptômes de la pourriture molle et peuvent infecter une large gamme de végétaux.

Les *Dickeya* sont désormais bien implantées dans les pays européens (Czajkowski et al., 2010): depuis quelques années, les producteurs d'endive et de pomme de terre du nord de la France font face à la multiplication des infections causées par les *Dickeya solani* et *dianthicola*. La contamination d'une récolte peut engendrer des pertes économiques élevées étant donnée la facilité de propagation et de persistance de ces bactéries (Toth et al., 2011); la surveillance des populations des *Dickeya* ainsi que le contrôle des infections qu'elles engendrent sont désormais une préoccupation agronomique en Europe (Czajkowski et al., 2010; Glasner et al., 2011). Les informations relatées ci-dessous concernent essentiellement la bactérie modèle *D. dadantii* 3937. La souche *D. dadantii* 3937 a été isolée en France en 1982 à partir d'une plante ornementale, la violette africaine (*Saintpaulia ionantha*), cultivée en serre (Kotoujansky et al., 1982). Le fort pouvoir pectinolytique de *D. dadantii* combiné aux données génomiques, génétiques et biochimiques accumulées depuis plus de 30 années en ont fait un organisme de référence pour la communauté scientifique internationale. Elle est par ailleurs classée en 9^{ème} position (ex-aequo avec *D. solani*) dans le « top 10 » des bactéries phytopathogènes (Mansfield et al., 2012; Toth et al., 2011). Comme la majorité des *Dickeya*, *D. dadantii* 3937 est capable d'infecter une large gamme d'espèces végétales, parmi lesquelles la pomme de terre et l'endive. Elle induit les symptômes caractéristiques de « pourriture molle » sur les tissus végétaux et de « jambe noire » au niveau des tiges. Ces symptômes sont liés à la synthèse et à la sécrétion par *D. dadantii* de tout un arsenal d'enzymes qui dégradent les parois des cellules végétales. Toutefois, l'interaction entre *D. dadantii* et ses hôtes est un processus complexe impliquant la production de facteurs de virulence multiples.

B) Cycle de vie

Les bactéries pathogènes des plantes sont continuellement exposées aux changements environnementaux. Elles doivent résister contre l'exposition aux rayons ultra-violet, la disponibilité en eau, les variations de pH ou de température. Les *Dickeya* peuvent vivre comme épiphytes ou comme saprophytes dans le sol et les eaux souterraines jusqu'à ce qu'ils rencontrent un hôte sensible et/ou que les conditions environnementales deviennent favorables à une infection. Par ailleurs, les *Dickeya* sont capables d'infecter les insectes, ces derniers représentant ainsi une niche écologique accessoire favorisant la dissémination de ce

genre bactérien (Grenier et al., 2006). La figure 28 présente le cycle de vie de *Dickeya* lors d'une culture annuelle de pomme de terre. Trois étapes se succèdent lors de l'infection : 1) l'adhésion à la surface des plantes et la pénétration intra-tissulaire *via* une blessure préexistante ou une ouverture naturelle (stomates) ou encore lors du pompage de la sève par un puceron infecté ; 2) l'invasion de l'apoplaste (ensemble des interstices cellulaires qui sert au transport radial de l'eau et des solutés) ; et (iii) la dégradation des parois cellulaires végétales. Les bactéries peuvent aussi attendre dans l'apoplaste, en se servant des ressources nutritives de la plante, et causer une infection latente dite asymptomatique (Reverchon and Nasser, 2013). Par la suite, l'infection peut s'enclencher lorsque les conditions deviennent plus favorables (température favorable de 28-30°C, humidité élevée et disponibilité en oxygène faible).

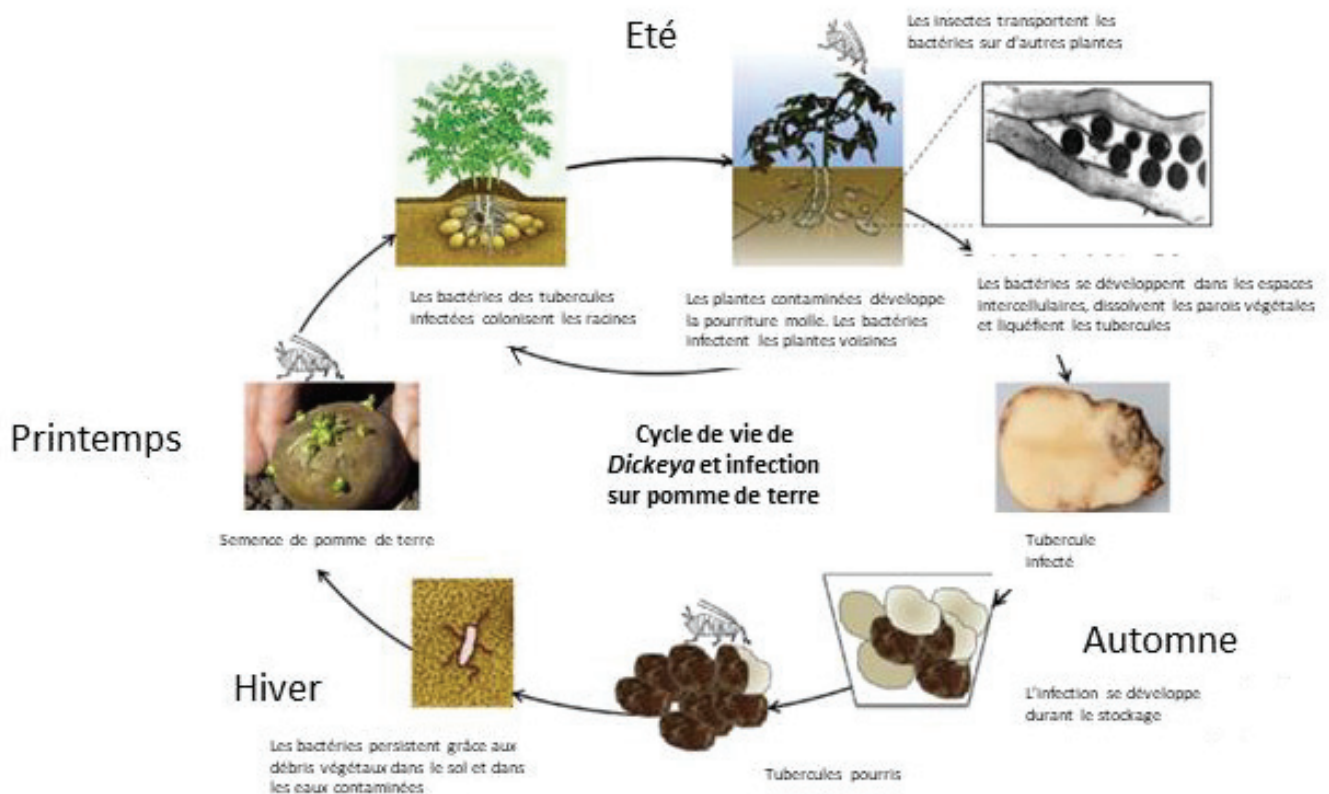


Figure 28 : Cycle de vie de *Dickeya dadantii* (adapté de la source Reverchon et al, 2013). Au printemps les bactéries se trouvent sur les tubercules puis en été les bactéries des semences se développent dans les espaces intercellulaires et liquéfient le tubercule mère en infectant la descendance. A l'automne les bactéries émergentes peuvent migrer à travers le sol et infectées de nouvelles plantes. La pourriture molle se produit lorsque la bactérie accède au tubercule par des blessures ou d'autres points d'entrée. Les blessures causées lors de la récolte fournissent de multiples points d'entrée dans le tubercule, et l'infection peut se propager pendant le stockage. Les tubercules pourris jetés peuvent permettre la dispersion de *Dickeya* dans l'environnement. Pendant l'hiver, *Dickeya* survit en association avec les résidus de culture dans le sol.

C) Pouvoir pathogène et virulence

a. *Dickeya dadantii*, modèle pour la virulence

Les espèces de *Dickeya* ont fait l'objet d'une attention considérable ces dernières années en raison de leur émergence dans le monde entier où elles causent des pertes économiques majeures en infectant des cultures importantes sur le plan agricole (Blin et al., 2021). Parmi ces bactéries, trois espèces sont particulièrement étudiées : *D. dadantii* sur laquelle la majorité des études génétiques et de physiopathologiques ont été réalisées (Reverchon and Nasser, 2013), *D. dianthicola* et *D. solani* qui ont récemment envahi les agrosystèmes de la pomme de terre en Europe (Blin et al., 2021). Bien qu'étroitement apparentées, ces bactéries présentent néanmoins des spécificités métaboliques et de régulation de l'expression des gènes de virulence qui pourraient être liées à leurs différentes capacités à envahir les agrosystèmes (Blin et al., 2021; Golanowska et al., 2018; Raoul des Essarts et al., 2019). Ces trois espèces partagent plus de 80 % de protéines mais présentent des réarrangements génomiques intéressants (figure 29).

Alignement des génomes

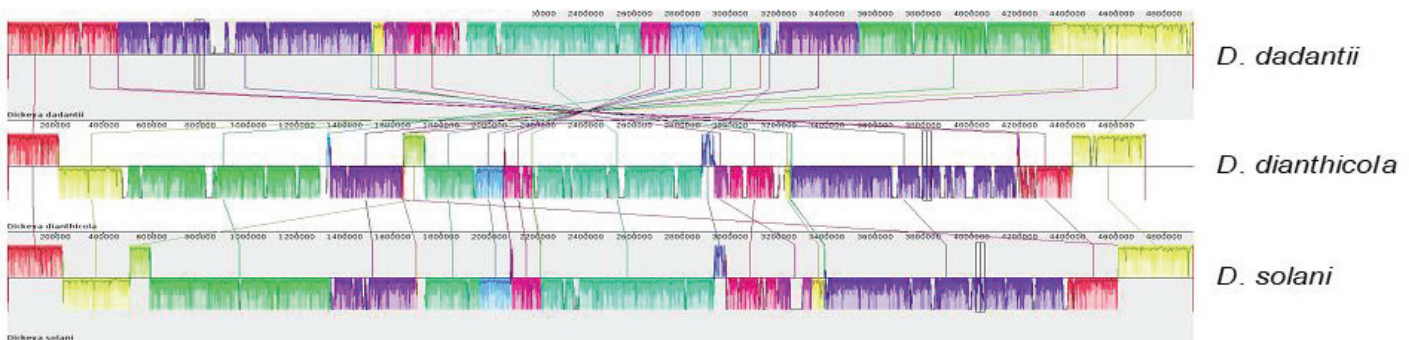


Figure 29 : Alignement des génomes des espèces de *D. dadantii*, *D. dianthicola* et *D. solani*. Les espèces plus de 80% de protéines communes partagent mais présentent des arrangements génomiques variables.

b. Diversité des facteurs de virulence

En plus des facteurs d'agression, *D. dadantii* utilise un arsenal de facteurs de virulence additionnels, ubiquitaires à de nombreuses bactéries pathogènes, pour s'acclimater aux

conditions de l'hôte et favoriser une colonisation efficace : la mobilité (Mulholland et al., 1993), les exopolysaccharides de surface (EPS) (Condemine et al., 1999), les systèmes d'acquisition du fer (Enard et al., 1988), les structures de biofilms (Prigent-Combaret et al., 2001), ou encore les systèmes de protection contre les réactions de défense de l'hôte (Reverchon et al., 2002). Les facteurs d'adhésion tels que les EPS, les biofilms ou les biosurfactants sont synthétisés dans les premières étapes d'infection (Charkowski et al., 2012; Enard et al., 1988). Ces composés confèrent aux bactéries un pouvoir d'adhésion sur les tissus végétaux et une protection contre les stress hydriques. Ainsi protégées et fixées, elles attendent une ouverture pour pénétrer l'épiderme végétal. Après la pénétration à l'intérieur des tissus végétaux, les bactéries se trouvent dans l'apoplaste, un milieu acide, carencé en fer et riche en radicaux chargés pouvant générer un stress oxydant (Reverchon and Nasser, 2013). Durant ces premières phases d'interaction avec l'hôte, les systèmes d'acclimatation et de survie dans ces conditions hostiles sont privilégiés par la bactérie. Ainsi seront produits par exemple des sidérophores de séquestration à haute affinité du fer (Boughammoura et al., 2008) et des systèmes permettant à la bactérie de résister aux stress acide et oxydant (Jiang et al., 2016; Reverchon et al., 2002).

Lorsque les bactéries se sont acclimatées aux conditions de l'hôte et se sont suffisamment multipliées pour enclencher l'agression, elles induisent brutalement la synthèse d'une abondante quantité d'enzymes dégradatives qui vont agir sur les parois des cellules de l'hôte (composées majoritairement de pectine, de cellulose) : des pectinases, des cellulases et des protéases. Une classe de pectinase, les pectate lyases, est considérée comme le facteur de virulence essentiel de *D. dadantii* car purifiées, ces enzymes sont capables de reproduire le symptôme de pourriture molle (Reverchon and Nasser, 2013). *D. dadantii* produit plus d'une quinzaine de pectinases ayant des actions synergiques et complémentaires pour dégrader les pectines qui sont des substrats complexes et variés. La sécrétion des pectinases (Condemine and Robert-Baudouy, 1991) et de la cellulase majeure CelZ (Py et al., 1991) est réalisée par le système de sécrétion de type II « Out » (Condemine et al., 1992). L'inactivation du système de sécrétion Out conduit à une perte de la virulence, confirmant ainsi le caractère primordial des pectinases et de la cellulase majeure dans la macération des tissus végétaux. La sécrétion des protéases, est quant à elle réalisée par le système de sécrétion de type I « PrtDEF » (Létoffé et al., 1990). Les gènes de pectinases se répartissent en quatorze *loci* sur le chromosome

bactérien. Certains contiennent un gène isolé comme *pell*, *pell* ou *pelZ*, d'autres en regroupent plusieurs. Les gènes codant les pectinases PelA, PelB, PelC, PelD et PelE, qui sont responsables de 95% de l'activité pectate lyases *in vitro*, sont divisés en deux *loci* (*pelA-pelE-pelD-paeY-pmeA* et *pelB-pelC-pelZ*) éloignés par environ 850 kilobases. Tous ces gènes sont des unités transcriptionnelles indépendantes mais dans certaines conditions des transcrits polycistroniques couvrant les gènes *pelD-paeY-pmeA* et *pelC-pelZ* ont été observés (Forquet et al., 2022; Pissavin et al., 1998; Shevchik and Hugouvieux-Cotte-Pattat, 1997). Ainsi, des régulations différentielles au niveau de l'expression de ces gènes de pectinase pourraient permettre aux bactéries de répondre de manière cohérente aux différents types de pectine rencontrés pendant l'infection de leurs différents hôtes (Charkowski et al., 2012; Hugouvieux-Cotte-Pattat et al., 1996). La figure 30 illustre la chronologie de la synthèse des différents acteurs requis par *D. dadantii* aux différentes étapes de l'infection.

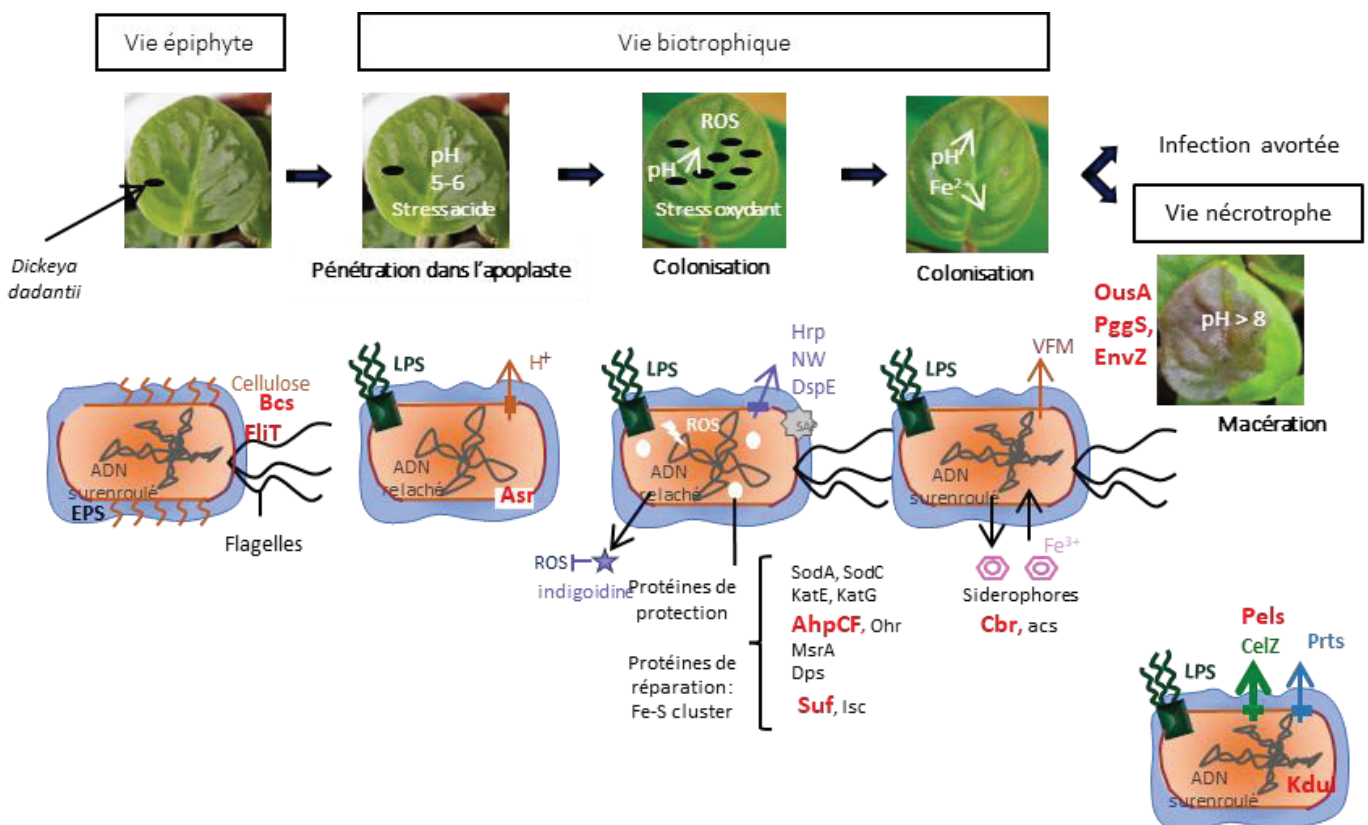


Figure 30 : Les facteurs de la virulence et d'acclimation de *Dickeya dadantii*. Ce modèle de travail prend en considération les variations des conditions environnementales et de l'état de superenroulement de l'ADN, et leur impact sur la production des systèmes de virulence et d'adaptation de *D. dadantii* pendant l'infection des plantes. L'attachement de *D. dadantii* aux surfaces végétales est médié par des fibrilles de cellulose et des exopolysaccharides (EPS). A ce stade, les flagelles sont produits et la chimiotaxie vers l'acide jasmonique, qui est produit par les tissus blessés, favorise l'entrée dans l'apoplaste. Tous ces gènes, qui sont nécessaires pour la vie

épiphyte de *D. dadantii*, sont préférentiellement exprimés lorsque l'ADN est fortement super enroulé. Ceci nous permet de supposer que pendant la vie épiphyte, l'ADN génomique de *D. dadantii* est fortement super enroulé. Lors de l'entrée dans l'apoplaste, le pH acide induit une relaxation de l'ADN. Pour faire face au stress acide, les bactéries utilisent divers systèmes d'antiport anion/H⁺ pour pomper les protons. En même temps, un remodelage de l'enveloppe bactérienne se produit, le LPS est décoré et la protéine de choc acide périplasmique Asr nécessaire à la survie en condition acide est induite. Progressivement, une alcalinisation des tissus végétaux est observée et les bactéries se multiplient. La réponse de défense de la plante à l'invasion de pathogènes conduit à la production de peptides antimicrobiens et de ROS, qui induisent également une relaxation de l'ADN. Les LPS modifiés favorisent la survie des bactéries en augmentant leur résistance aux peptides antimicrobiens cationiques, qui sont également internalisés par le système de transport SAP pour être dégradés dans le cytoplasme. Pour résister au stress oxydatif, *D. dadantii* synthétise des protéines protectrices comme les superoxyde dismutases (SodA et SodC), les catalases (KatE et KatG), l'alkylhydroperoxyde réductase (AphCF), les systèmes d'assemblage et de réparation des centres Fe-S (Suf, Isc), la mini-ferritine (Dps) et un pigment bleu, l'indigoidine, qui piège les ROS. À ce stade, soit les bactéries survivent et le processus d'infection se poursuit, soit elles meurent, ce qui entraîne une infection avortée. Lorsque l'infection progresse, les bactéries entament un nouveau cycle de multiplication et l'ADN est à nouveau fortement super enroulé. L'alcalinisation des tissus végétaux entraîne une diminution de la solubilité du fer, et les bactéries induisent la production de sidérophores pour piéger le fer. Elles synthétisent de l'auxine et produisent le signal de détection du quorum VFM. Lorsqu'une population bactérienne à haute densité est atteinte, les enzymes de dégradation des parois végétales appelées CWDE des plantes sont alors produites (Pels, CelZ et Prts). La macération des tissus végétaux et la lyse cellulaire se produisent et, par conséquent, la libération du contenu vacuolaire dans l'apoplaste crée des conditions de choc osmotique pour l'agent pathogène, ce qui entraîne l'induction de gènes d'osmoprotection, dont *ousA* et *pggS-pggP* codant respectivement pour un système de transport d'osmoprotectant et la biosynthèse de l'osmolyte α -glucosylglycérate.

Au regard de la diversité des facteurs de virulence de *D. dadantii* requis pour une infection des hôtes il est évident qu'un processus d'infection efficace nécessite une expression spatio-temporelle correcte des différents facteurs de virulence en réponse aux changements des conditions environnementales durant la pathogénèse. De plus, la production de ces facteurs de virulence, notamment des enzymes dégradant la paroi cellulaire et en particulier de pectate lyases chez *D. dadantii* est influencée par des stimuli physico-chimiques variés, tels que la température, l'osmolarité, le pH et le stress oxydatif (Ouafa et al., 2012; Reverchon and Nasser, 2013).

Dans les étapes précoces de l'infection, la synthèse des systèmes d'acclimatation aux conditions hostiles des espaces intercellulaires de l'hôte est privilégiée pour permettre à la bactérie de survivre mais aussi d'échapper aux réactions de l'hôte (Reverchon et al., 2016). En effet, les oligogalacturonides issus de la dégradation de la paroi des végétaux par les enzymes extracellulaires de *D. dadantii* induisent les réactions de défense de l'hôte. Ainsi une production abondante de ces composés en début d'infection, lorsque les bactéries sont en quantité limitée, risquerait d'anéantir la poursuite de l'infection. La production limitée des

enzymes extracellulaires et la mise en place appropriée des systèmes requis permettent à la bactérie de proliférer, via les ressources disponibles dans les espaces intercellulaires et celles générées par la quantité relativement faible des enzymes dégradatives, tout en évitant d'éveiller les réactions de défense de l'hôte. Dans les stades avancés de l'infection, lorsque la densité bactérienne sera suffisante pour déclencher l'attaque, *D. dadantii* induit brutalement une production abondante d'enzymes de dégradation pour submerger et coloniser l'hôte.

De nombreux régulateurs interviennent dans la coordination du processus infectieux et implique la topologie de l'ADN, les NAPs, les facteurs de transcription et les ARN régulateurs. La grande majorité de ces régulateurs ont été identifiés via leur action sur la synthèse des Pels; ces régulateurs répondent à des signaux variés : la présence de pectine (Kdgr) (Nasser et al., 1994; Reverchon et al., 1991) ou des composés de plante (Pir) (Nomura et al., 1998, 1999), le stress oxydant (PecS) (Hommais et al., 2008; Reverchon et al., 1994), la répression catabolique (CRP) (Nasser et al., 1997; Reverchon et al., 1997), la densité cellulaire (Vfm) (Nasser et al., 2013), la carence en fer (Fur) (Franza et al., 2002), la phase de croissance (Fis) (Lautier and Nasser, 2007), la température (PecT) (Hérault et al., 2014). Ces régulateurs sont organisés en un réseau complexe et agissent de manière coordonnée pour moduler finement la synthèse des Pels (Sepulchre et al., 2007), (figure 31). Les NAPs Fis et H-NS jouent un rôle important dans ce réseau de régulation (Reverchon and Nasser, 2013; Reverchon et al., 2016; Sepulchre et al., 2007). La plupart de ces régulateurs contrôlent également la synthèse d'autres facteurs de virulence ou d'acclimatation. Ainsi, H-NS et PecT contrôlent la synthèse de protéines impliquées dans la mobilité via les flagelles, la production d'EPS, la synthèse des protéases et de la cellulase majeure (Hugouvieux-Cotte-Pattat et al., 1996; Nasser and Reverchon, 2002); PecS module la production des acteurs permettant à *D. dadantii* de résister contre le stress oxydant, d'un surfactant permettant la mobilité de surface et la mobilité via les flagelles, les protéases et la cellulase majeure (Hommais et al., 2011; Reverchon et al., 2002); Fis contrôle la synthèse de systèmes impliqués dans la neutralisation des peptides antimicrobiens, la mobilité via les flagelles, le système de sécrétion de type 2, la formation de biofilms ainsi que des protéases et la cellulase majeure (Jiang et al., 2015; Lautier and Nasser, 2007; Prigent-Combaret et al., 2012). La synthèse des *pels* est donc couplée à celle d'autres fonctions importantes pour la survie de la bactérie dans la plante. Par ailleurs, il a été montré récemment que le niveau d'enroulement de l'ADN module la synthèse des *pels* et que

les NAPs, FIS et H-NS, interviennent dans ce contrôle s'exerçant sur les gènes *pels*. FIS jouerait essentiellement un rôle architectural qui consisterait à atténuer l'impact des conditions physiologiques et environnementales sur le relâchement de l'ADN. En revanche, H-NS s'est avéré être le régulateur dont l'action est modulée par le niveau d'enroulement de l'ADN. Son action répressive sur les gènes *pels* est d'autant plus forte que l'ADN est relâché et insignifiante lorsque l'ADN a un niveau de surenroulement négatif prononcé (Ouafa et al., 2012). Les mutants inactivés pour chacune de ces deux NAPs ont une virulence fortement atténuée en comparaison de celle de la souche parentale (Lautier and Nasser, 2007; Nasser et al., 2001).

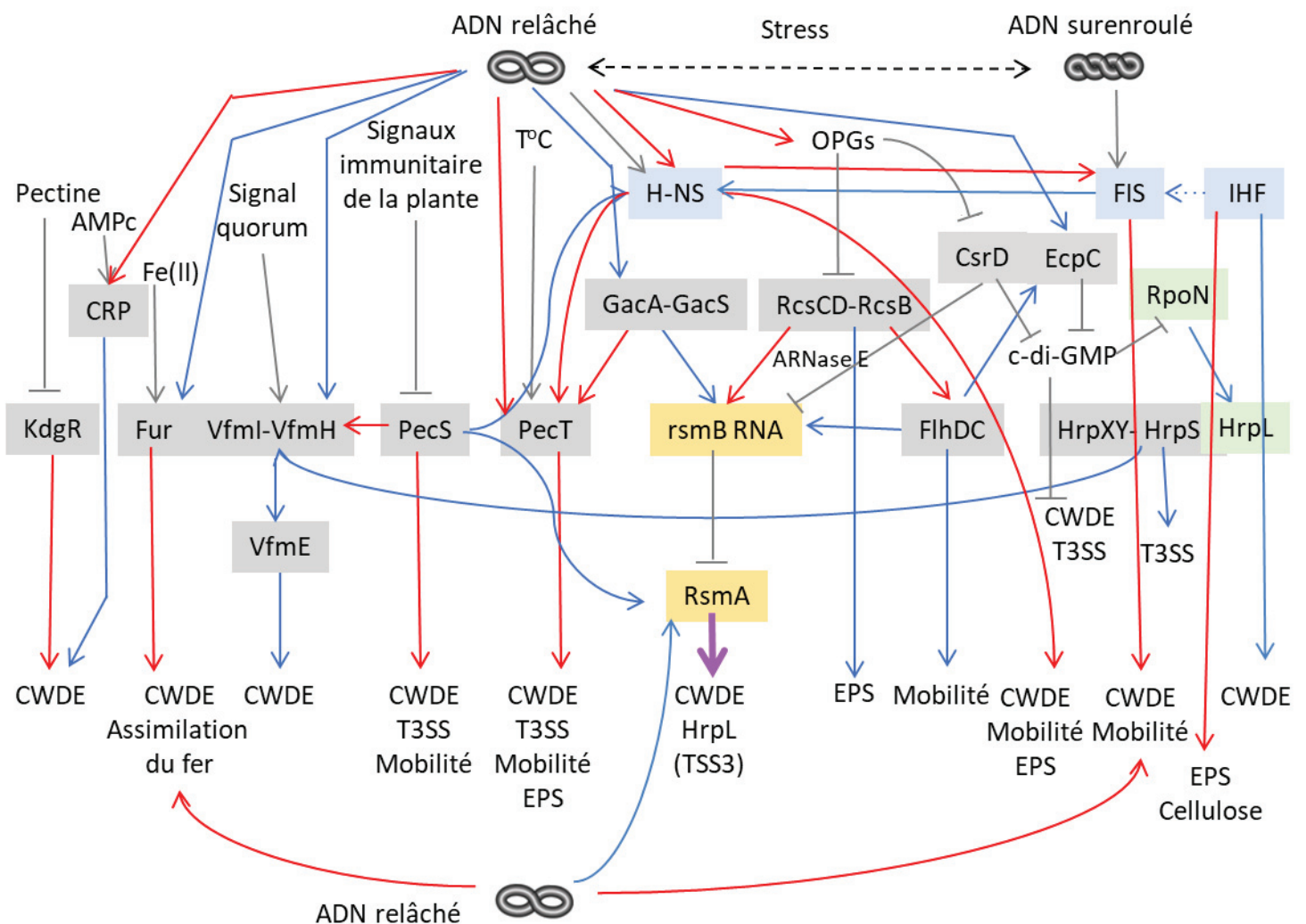


Figure 31 : Réseau de régulation des facteurs de virulence chez *D. dadantii*. La régulation a lieu à différents niveaux : au niveau du surenroulement de l'ADN, des protéines NAPs (en bleu), des facteurs de transcription (en vert), des gènes codant de protéines de virulence (en gris) et des ARN (en jaune).

D'autres analyses ont fourni des informations importantes en révélant des changements spécifiques dans l'expression des gènes de virulence et d'acclimatation induits par les stress environnementaux via divers domaines d'expression chromosomique (CODOS) (Jiang et al., 2015). Cette organisation a été précédemment présentée (voir figure 19). Enfin en plus des domaines d'expression chromosomiques, il a été proposé une structuration spatiale du nucléoïde permettant une production et une translocation synchronisées des Pels.

Comme précédemment indiqué, les principaux facteurs de virulence de *D. dadantii* (pectate lyases) sont exportés dans le milieu extracellulaire par un système de sécrétion spécifique de type II (Gu et al., 2017). Les gènes codant pour les *pels*, l'appareil sécrétoire de type II, les transporteurs membranaires, et les enzymes intracellulaires du catabolisme de la pectine, sont co-régulés par le facteur de transcription KdgR qui est responsable de leur induction en présence de pectine (Nasser et al., 1994; Reverchon et al., 1991). Tous ces gènes sont dispersés en de multiples îlots le long du génome ce qui pose la question de la synchronisation de leur expression et de la translocation des pectinases à travers les membranes interne et externe. Une étude bio-informatique à l'aide de l'algorithme « pattern » a révélé que les cibles de KdgR sont distribuées périodiquement et forment ensemble un "archipel" unique, organisé de manière cohérente à l'échelle du génome sur le chromosome (figure 32). Cette organisation favorise la synchronisation de l'expression de ces gènes co-régulés par KdgR (Bouyioukos et al., 2016). De plus, ces analyses ont révélé que la majorité des gènes codant les pectinases sécrétées sont exprimés à partir du même brin d'ADN. Cette organisation pouvant favoriser l'acheminement efficace des pectinases nouvellement synthétisées vers un point convergent de la cellule afin de promouvoir leur sécrétion optimale et coordonnée via le système de sécrétion de type II.

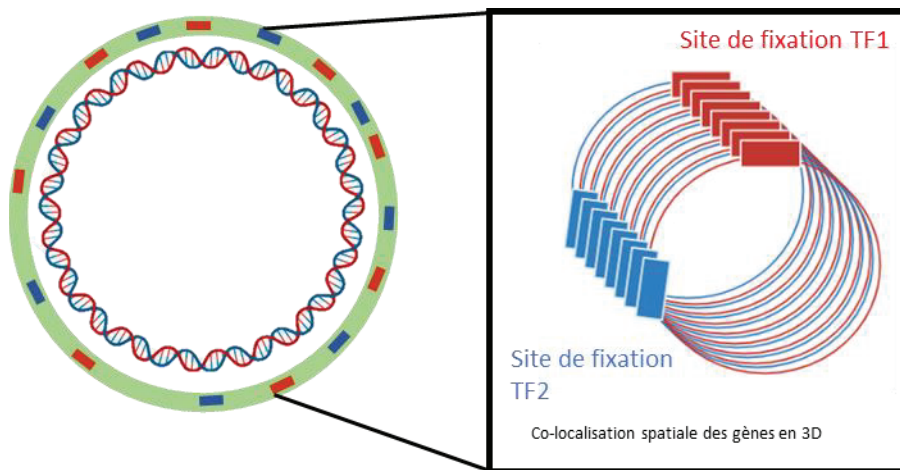


Figure 32 : Répartition périodique des gènes co-régulés sur le chromosome. La répartition spatiale des gènes dispersés le long du génome peut donner lieu à des archipels de gènes co-exprimés.

Ainsi, il apparaît de manière évidente que la régulation des fonctions de virulence de *D. dadantii* implique un réseau complexe et multi échelle. L'existence d'un tel réseau de régulation pourrait permettre à *D. dadantii* de moduler finement la synthèse de ses fonctions de virulence, notamment des *pels* en fonction des conditions environnementales et de son état physiologique. Par ailleurs, l'intégration de l'action de l'architecture et de la dynamique du nucléoïde ainsi que de celles des NAPs et des régulateurs transcriptionnels moins globaux, apparaît essentielle pour accorder la synthèse des facteurs de virulence et le fitness de la bactérie, deux facteurs primordiaux dans la mise en place d'une colonisation efficace lors de l'infection d'un hôte.

3) Objectifs de la thèse

Comme évoqué dans l'introduction bibliographique, la régulation de l'expression génique s'avère beaucoup plus complexe que le modèle de base proposé par Jacob et Monod. Il apparaît désormais évident que l'organisation spatiale et la dynamique du nucléoïde bactérien jouent un rôle important dans l'expression génique. Alors que le rôle de ces nouveaux acteurs est relativement bien illustré pour les processus fondamentaux (cycles cellulaire, métabolisme de base, croissance cellulaire) très peu d'informations sont

disponibles à propos de leur implication dans des processus d'acclimatation en relation avec les variations des conditions environnementales. Les travaux réalisés ces derniers temps, sur *D. dadantii* notamment par mon équipe d'accueil, ont apporté des informations dans ce champs d'étude avec la mise en évidence des CODOs dont la structuration transitoire est modulée par les conditions environnementales et les NAPs, la modulation de la synthèse des *pels* par la coopération dynamique entre le niveau d'enroulement de l'ADN et les NAPs, la structuration en « archipel » des gènes impliqués dans le catabolisme de la pectine pour permettre leur co-régulation par KdgR ainsi qu'une synchronisation de leur synthèse. Ainsi, *D. dadantii* s'avère être un système biologique ayant un processus infectieux très bien caractérisé, impliquant des changements transcriptionnels précis dans le temps dont les acteurs sont relativement bien connus. Ce travail vise à approfondir les relations entre dynamique du chromosome et expression génique en fonction des conditions environnementales. Notre hypothèse est que les conditions environnementales modifient la conformation du chromosome ce qui influence l'expression génique. *D. dadantii* s'avère être un modèle de choix pour ces investigations. L'objectif de mon projet de thèse était de combiner des approches de génétique moléculaire couplées à la microscopie à haute résolution pour analyser la dynamique de différents loci localisés dans les CODOs et dont l'expression est modulée par les conditions environnementales rencontrées par *D. dadantii* au cours du processus infectieux. Par la suite, les mécanismes d'action responsables des éventuelles relocalisation subcellulaires des loci en fonction des changements des conditions devraient être explorées via l'analyse de l'impact des NAPs et du niveau d'enroulement du nucléoïde. Mon équipe d'accueil possède les compétences de génétique et de physiologie sur la bactérie *D. dadantii* ; une collaboration a été établie avec C Lesterlin (MSSB UMR CNRS-UCB 5086 Lyon-Gerland), expert de l'utilisation de la microscopie à haute résolution pour l'étude des processus biologiques, de manière à disposer des compétences complémentaires requises pour l'exécution de mon projet de thèse.

Partie II : Matériel et méthodes

1) Souches bactériennes et plasmides

Les différentes souches bactériennes de *Dickeya dadantii* sont toutes dérivées d'un ancêtre commun, la souche 3937 isolée de *Saintpaulia ionantha*. Elles sont présentées dans le tableau 1 avec les diverses souches d'*Escherichia coli* utilisées lors de l'étude. L'ensemble des plasmides construits ou utilisés dans l'étude sont présentés dans le tableau 2.

Souche	Génotype	Source
<i>Escherichia coli</i>		
<i>DH5α</i>	F– ΔlacZ M15 ΔlacZYA-argF U169 recA1 endA1 hsdR17 (rK–, mK+) phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1	(Woodcock et al., 1989)
<i>DH5α λpir</i>	endA1 hsdR17 glnV44 (= supE44) thi-1 recA1 gyrA96 relA1 φ80dlacΔ(lacZ)M15 Δ(lacZYA-argF)U169 zdg-232::Tn10 uidA::pir+	(Platt et al., 2000)
<i>Dickeya dadantii</i>		
3937 (A4922-D0039)	Souche sauvage isolée de <i>Saintpaulia ionantha</i>	(Kotoujansky et al., 1982)
D0027	A4922 <i>ter</i> :: <i>parSP1</i> -Rif ^R	Ce travail
D0028	A4922 <i>oriC</i> :: <i>parSpMT1</i> -Cm ^R	Ce travail
D0029	A4922 <i>ahpC</i> :: <i>parSpMT1</i> -Cm ^R	Ce travail
D0030	A4922 <i>ousA</i> :: <i>parSP1</i> -Rif ^R	Ce travail
D0031	A4922 <i>fliT</i> :: <i>parSpMT1</i> -Cm ^R	Clément Matarfi
D0032	<i>ousA</i> :: <i>parSP1</i> -Rif ^R , <i>fliT</i> :: <i>parSpMT1</i> -Cm ^R	Ce travail
D0037	A4922 <i>hns</i> :: <i>kanR</i>	Collection du laboratoire
D0038	A4922 <i>fis</i> :: <i>kanR</i>	Collection du laboratoire
D0040	A4922 <i>cbrB</i> :: <i>parSpMT1</i> -Cm ^R	Ce travail
D0061	<i>ter</i> :: <i>parSP1</i> -Rif ^R , <i>oriC</i> :: <i>parSpMT1</i> -Cm ^R	Ce travail
D0136	A4922 <i>kdul</i> :: <i>parSP1</i> -Rif ^R	Ce travail
D0137	<i>kdul</i> :: <i>parSP1</i> -Rif ^R , <i>cbrB</i> :: <i>parSpMT1</i> -Cm ^R	Ce travail
D0161	A4922 <i>asr</i> :: <i>parSpMT1</i> -Cm ^R	Ce travail
D0184	A4922 <i>pggS</i> :: <i>parSP1</i> -Rif ^R	Ce travail
D0187	<i>pggS</i> :: <i>parSP1</i> -Rif ^R , <i>asr</i> :: <i>parSpMT1</i> -Cm ^R	Ce travail

Tableau 1 : Souches utilisées ou construites durant l'étude.

Nom du plasmide	Résistance et Taille	Source
pBluescript – RRpelB	AmpR 3,5 kb	Collection laboratoire
pBluescript – RR <i>pelB</i> :: <i>parSp1</i> -RifR	AmpR, RifR 4,8 kb	Clément Matarfi
pGEM-T	AmpR 3 kb	Promega
pGEM-T – <i>fliT</i>	AmpR 4 kb	Collection laboratoire
pGEM-T – <i>ousA</i>	AmpR 4 kb	Collection laboratoire
pGEM-T – <i>oriC</i>	AmpR 3,5 kb	Ce travail
pGEM-T – <i>ter</i>	AmpR 3,5 kb	Clément Matarfi
pGEM-T – <i>asr</i>	AmpR 3,5 kb	Ce travail
pGEM-T – <i>pggS</i>	AmpR 3,5 kb	Jessica Baude
pGEM-T – <i>kdul</i>	AmpR 3,5 kb	Ce travail
pGEM-T – <i>cbrB</i>	AmpR 3,5 kb	Ce travail
pGEM-T – <i>ahpC</i>	AmpR 3,5 kb	Ce travail
pGEM-T – <i>fliT</i> :: <i>parSpMT1</i> -CmR	AmpR , CmR 5,5 kb	Clément Matarfi
pGEM-T – <i>pelA</i> :: <i>parSpMT1</i> -CmR	AmpR , CmR 5,5 kb	Clément Matarfi
pGEM-T – <i>ousA</i> :: <i>parSP1</i> -TnpR	AmpR, TnpR 5 kb	Clément Matarfi
pGEM-T – <i>ousA</i> :: <i>parSP1</i> -RifR	AmpR, RifR 5,3 kb	Clément Matarfi
pGEM-T – <i>oriC</i> :: <i>parSpMT1</i> -CmR	AmpR , CmR 5 kb	Ce travail
pGEM-T – <i>ter</i> :: <i>parSP1</i> -RifR	AmpR, RifR 4,7 kb	Ce travail
pGEM-T – <i>cbrB</i> :: <i>parSpMT1</i> -CmR	AmpR , CmR 5 kb	Ce travail
pGEM-T – <i>kdul</i> :: <i>parSP1</i> -RifR	AmpR, RifR 4,7 kb	Ce travail
pGEM-T – <i>asr</i> :: <i>parSpMT1</i> -CmR	AmpR , CmR 5 kb	Ce travail
pGEM-T – <i>pggS</i> :: <i>parSP1</i> -RifR	AmpR, RifR 4,7 kb	Ce travail
pGEM-T – <i>ahpC</i> :: <i>parSpMT1</i> -CmR	AmpR , CmR 5 kb	Ce travail
pFHC2973	AmpR 7,4kb	Nielsen et al. 2006
p2973	AmpR 7,4 kb	Christian Lesterlin
pSN70	AmpR 5,7kb	Christian Lesterlin
pKuba	AmpR 5,6kb	Christian Lesterlin
pGBKD3 – <i>parSpMT1</i> -CmR	SmR, CmR 5,4 kb	Olivier Espeli
pGBKD3 – <i>parSP1</i> -TnpR	SmR, TnpR 5 kb	Olivier Espeli
pGBKD3 – <i>parSP1</i> -RifR	SmR, RifR 5,2 kb	Olivier Espeli
pBBRpBAD	AmpR, 6,5kb	Collection Laboratoire
pRE112	CmR, 5,7kb	Erwan Gueguen
pWSK29	AmpR, 5,4kb	Collection Laboratoire
pWSK130	KanR, 6,8kb	Collection Laboratoire

Tableau 2 : Plasmides utilisés ou construits durant l'étude.

Les souches d'*E. coli* et de *D. dadantii* sont cultivées, sous agitation, en milieu riche Luria-Bertani (LB) ou en milieu minimum M63 (Miller, 1972) supplémenté en une source de carbone (glucose ou saccharose à 2 g/L (W/V)). Les milieux solides équivalents sont obtenus par ajout d'agar à 12 g/L (W/V). D'une manière générale, les souches d'*E. coli* ont été incubées à 37°C et celles de *D. dadantii* à 30°C avec une agitation constante (220-250rpm). La densité

bactérienne a été suivie par mesure de la turbidité, exprimée en unités d'absorption à 600 nm (DO_{600}). Si nécessaire, des antibiotiques ont été ajoutés aux milieux selon les concentrations décrites dans le tableau 3. Les souches d'*E. coli* et de *D. dadantii* sont conservées à -80°C dans du glycérol 40% (V/V).

Antibiotique	Concentration
Ampicilline (Amp)	100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$
Carbenicilline (Carb)	100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$
Chloramphénicol (Cm)	20 $\mu\text{g.mL}^{-1}$
Rifampicine (Rif)	10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$
Streptomycine (Sm)	100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$
Triméthoprime (Tmp)	300 $\mu\text{g.mL}^{-1}$

Tableau 3 : Antibiotiques utilisés durant l'étude avec les concentrations d'utilisation.

2) Techniques globales de biologie moléculaire et de génétique

Les méthodes d'extraction d'ADN plasmidique par lyse alcaline, de digestion par des enzymes de restriction, de ligature de l'ADN et d'électrophorèse sur gel d'agarose ont été effectuées selon Sambrook & Russel (2001).

Les extractions d'ADN en routine ont été réalisées avec le kit Qiaprep Spin Miniprep kit (Qiagen). Les extractions de plasmides en grande quantité ont été réalisées avec le kit Qiagen Plasmid Midi (Qiagen) en suivant les instructions du fournisseur. Les plasmides soumis au séquençage ont été extraits avec le kit NucleoSpin® Plasmid QuickPure (Macherey-Nagel).

Les transformations d'*E. coli* ont été réalisées par choc thermique sur des cellules rendues compétentes après traitement au CaCl_2 (Sambrook and Russell, 2006). Etant donné la sensibilité au froid de *D. dadantii*, les transformations de cette bactérie ont été réalisées par électroporation : cette technique consiste à appliquer des impulsions électriques sur des bactéries rendues électro-compétentes après plusieurs lavages successifs à l'eau. Ces lavages ont pour but d'éliminer les sels présents dans les milieux de culture qui en favorisant la formation d'arcs électriques diminuent l'efficacité de la transformation. De la même manière que pour le choc thermique, les impulsions électriques provoquent la formation de pores microscopiques dans la membrane plasmique de ces bactéries qui devient transitoirement perméable à l'ADN.

A) Transfert d'ADN par la technique de la transduction

La transduction est un mécanisme de transfert d'information génétique d'une bactérie donneuse vers une bactérie receveuse par l'intermédiaire d'un phage dit transducteur. Chez *D. dadantii*, le phage ϕ EC2 est utilisé (Resibois et al., 1984). Le lysat de phage est réalisé sur des bactéries donneuses en phase exponentielle de croissance. Ces bactéries sont cultivées dans un milieu liquide riche Luria-Bertani pendant environ 7 heures puis infectées par les phages ϕ EC2. Pour ceci, un volume de 200 μ L de cette culture est ajouté à un volume équivalent de phages de manière à avoir une multiplicité d'infection de 0,1 (1 phage / 10 bactéries). Après 20 min d'incubation à température ambiante, 5 mL de milieu riche Luria-Bertani semi-solide (0,4% d'agar) en surfusion est ajouté à la suspension cellulaire. Le mélange, vigoureusement agité afin de rompre les interactions phages-bactéries, est ensuite versé sur un milieu riche solide enrichi en glucose et en calcium. Après 16 heures d'incubation à 30°C, la surcouche d'agar contenant les lysats de phages est récupérée à l'aide de 5mL de milieu riche Luria-Bertani. Le lysat est stérilisé par l'ajout de quelques gouttes de chloroforme afin d'éliminer les bactéries non lysées. La solution ainsi obtenue est vortexée durant environ 10 s puis les débris cellulaires et l'agar sont éliminés par une centrifugation de 10 min à 5000rpm. Le surnageant contenant les phages est récupéré, supplémenté par une à deux gouttes de chloroforme pour maintenir la stérilité puis stocké à 4°C.

La transduction au sens stricte est réalisée en mélangeant 200 μ L d'une suspension de bactéries réceptrices avec 200 μ L de lysat de phages ayant infecté la souche donneuse. Après 20 min d'adsorption à température ambiante sans agitation, un volume de 1mL de milieu riche Luria-Bertani est ajouté et la suspension cellulaire est incubée pendant 1 à 2 heures à 30°C afin de favoriser la multiplication des cellules transduites. Les suspensions cellulaires sont étalées sur un milieu riche Luria-Bertani solide additionné de l'antibiotique permettant de sélectionner les bactéries transduites ; ces dernières apparaissent après une incubation de deux à trois jours à 30°C.

B) Extraction des ARN : méthode du « phénol chaud »

Des milieux de cultures sontensemencés à partir des précultures des souches requises puis sont incubés à 30°C comme précédemment décrit de manière à atteindre une DO finale de 0,2 à 0,3. Des volumes correspondants environ à 4×10^9 bactéries sont prélevés pour l'extraction des ARN cellulaires. Chaque extrait de culture ainsi prélevé est aussitôt centrifugé pendant 5 min à 6000 rpm à une température identique à celle des cultures. Le culot bactérien obtenu est immédiatement congelé dans l'azote liquide et conservé à -80°C en attendant l'extraction des ARN. Les ARN sont extraits suivant le protocole du phénol acide (pH 5,2) chaud (Schmitt et al., 1990). Les culots bactériens préalablement lysés sont immédiatement traités au phénol chaud (pH 5,2). Cette méthode repose sur une solubilité différentielle des composés cellulaires : l'ADN et les protéines sont insolubles à pH acide alors que les ARN restent solubles dans la phase aqueuse. Les culots bactériens ont été repris par 500 µL de tampon de lyse (AcNa 50 mM pH 5,2 ; EDTA 10 mM) puis transférés directement dans des tubes Eppendorf auxquels a été ajouté 60 µL d'une solution de SDS 10%. Un volume de 600 µL de phénol pH 5,2 préalablement chauffé à 65°C pendant 1 heure a été ajouté aux tubes contenant les suspensions bactériennes lysées : ce mélange a été incubé à 65°C pendant 5 min dans un bain Thermomixer (Eppendorf) avec une agitation maximale (1400 rpm). Les tubes ont ensuite été transférés à -80°C pendant 5 min pour achever la lyse bactérienne et précipiter le SDS en excès. Cette étape est suivie d'une centrifugation à une vitesse de 13000 rpm pendant 10 min à 12°C. Les surnageants ont été récupérés puis soumis à deux extractions par un volume d'un mélange phénol-chloroforme-alcool isoamylique (25:24:1) puis à une extraction par un volume de chloroforme-alcool isoamylique (24 :1) pour éliminer les traces résiduelles de phénol. La précipitation des acides nucléiques a ensuite été réalisée à -20°C après l'ajout de 3 volumes d'éthanol 100% et d'1/10 de volume d'acétate de sodium 3M. Après 45 min d'incubation à -20°C, les culots d'ARN ont été recueillis par une centrifugation de 10 min à 13000 rpm à 4°C puis lavés par 1 ml d'éthanol 70%. Les culots ont ensuite été séchés à 42°C pendant 10 min environ puis solubilisés par 100 µL d'eau « Nuclease-free » (Sigma). La qualité des ARN obtenus est évaluée par une électrophorèse sur un gel d'agarose 1% contenant du BrET à 0,5 µg/mL avant d'être révélé sous la lumière UV. Les échantillons de qualité convenable sont soit conservés à -80°C soit directement soumis à une digestion à la DNase I (New England Biolabs) pour éliminer les traces d'ADN contaminant. Dans ce dernier cas,

environ 2 unités d'enzyme sont utilisées par μg d'ARN en suivant les instructions du fournisseur. Après la digestion, une extraction au phénol-chloroforme-alcool isoamylique (25:24:1) est réalisée afin d'éliminer la DNase I. Pour vérifier l'absence d'ADN après le traitement, une réaction de PCR est effectuée sur 0,2 à 0,5 μg d'ARN en présence des amorces du gène de ménage *rpoA* qui code la sous-unité α de l'ARN polymérase de *D. dadantii*. Les échantillons pour lesquels une amplification d'ADN est observée subissent un traitement supplémentaire à la DNase I. Une nouvelle réaction de PCR est réalisée par la suite pour vérifier l'efficacité de ce nouveau traitement. La concentration en ARN des échantillons obtenus est mesurée spectrophotométriquement au ND-2000 (Nanodrop). Leur qualité est par la suite vérifiée sur un gel d'agarose à 1% coloré au BrET à 0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

C) Rétrotranscription

Les expériences de rétrotranscription ont généralement été réalisées sur 1 μg d'ARN purifié comme indiqué ci-dessus. Une quantité équivalente ($2 \cdot 10^4$ copies/ μL) de l'ARN de synthèse pAW est ajoutée à tous les échantillons d'ARN. Cet ARN sert de contrôle endogène et permet de normaliser les variations d'efficacité de la transcription inverse liées à la qualité des échantillons. Les ARN sont rétrotranscrits en ADN complémentaires (ADNc) à l'aide du kit « RevertAid First Strand cDNA Synthesis » (Fermentas) en suivant les instructions du fournisseur. La M-MuLV rétrotranscriptase utilisée est une ADN polymérase ARN dépendante isolée du rétrovirus de la leucémie murine. Les amorces sont des hexamères qui se fixent aléatoirement sur les matrices ARN. A la fin de la rétrotranscription, les échantillons ont été incubés à 70°C pendant 15 min pour dégrader les ARN engagés dans les complexes ARN-ADNc. En effet, les ARN deviennent instables à haute température en présence de fortes concentrations en ions magnésium (dans ce cas, 5 mM). Les ADNc néosynthétisés ont été aliquotés et conservés à -20°C.

D) PCR quantitative en temps réel (q-PCR)

La PCR quantitative est basée sur le même principe que la réaction de PCR classique mais présente l'intérêt supplémentaire de quantifier précisément et rapidement (environ 1h30) l'expression de gènes même faiblement exprimés. La quantification est basée sur la mesure, à chaque cycle, de la fluorescence émise par le SYBR Green qui s'est intercalé dans la double hélice d'ADN. Le kit « Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix » (Thermo scientific) a été utilisé. Pour chaque gène étudié par PCR quantitative en temps réel, une gamme étalon a été établie à partir de différentes dilutions de l'ADN génomique de la souche sauvage 3937 de *D. dadantii* purifié (de 1 à 10^{-5} ng/ μ L d'ADN). Elle permet d'évaluer l'efficacité de l'amplification mais aussi de quantifier les transcrits du gène d'intérêt présents dans les différents échantillons. La purification de l'ADN génomique de la souche sauvage 3937 de *D. dadantii* a été réalisée avec le kit « Wizard® Genomic DNA Purification » (Promega) en suivant les instructions du fournisseur. La concentration de l'ADN génomique extrait a été déterminée par mesure de l'absorption de la lumière à 260 nm. La qualité et la pureté de l'ADN génomique ont été analysées par électrophorèse sur gel d'agarose. L'ADN génomique a été conservé à -20°C.

Les amorces utilisées en qPCR sont présentées dans le tableau 4. Les milieux réactionnels sont préparés selon les instructions du fournisseur. Chaque réaction s'effectue sur 1 μ L d'échantillon (gamme étalon et ADNc) dans un volume final réactionnel de 10 μ L. Le logiciel calcule ensuite, pour chaque échantillon, le nombre de cycles nécessaire à la détection de la fluorescence dans la zone propice à la quantification (début de la phase linéaire d'émission de la fluorescence). Ce nombre de cycle correspond au Crossing Point (Cp). La comparaison des seuils de détection des ADNc avec les Cp de la gamme étalon permet de calculer leur concentration et de ce fait la quantité de transcrits du gène amplifié. Ces expressions « brutes » sont ensuite normalisées en se référant à l'expression d'un gène normalisateur. L'expression de ce gène doit être stable dans les conditions d'étude. Le rapport Q, calculé selon la formule $Q = [\text{ADNc}] \text{ gène d'intérêt} / [\text{ADNc}] \text{ gène de référence}$ sera le résultat exploité.

Gène	Sens	Antisens
<i>rpoA</i> (normalisateur)	AAACCGCGCCTGGTAGATA	CCTTTCAGGTTGAGCAGGAT
<i>lpxC</i> (normalisateur)	ACGGTAAGCGCATTCTGGTA	CATCCAGCAGCAGGTAGACA
<i>gcpF</i>	CCTACATTTCTCCCAACGCG	GGCGACAGAAACCGGTATTC
<i>Dda 3937 - 01102</i>	ATTGGATATCGGCTGCGGTA	GACTGTCGCCGAGGAAATTC
<i>Dda 3937 - 04138</i>	GGGATGGAGAACGTTACGGT	CCCGAAAGACACAAATGCGA
<i>Dda 3937 - 04139</i>	TCGGATGCACTGAAGGACAT	ATCGACCATATCTGCTCGCT
<i>ousA</i>	GCAACACGTGGAGAACTGG	CTTGCCATGTAGGTCAGCAG
<i>efeB</i>	GCGACATCATCAAGCAGACG	GCATTATCGCCGGTATTGGG
<i>fliS</i>	GCTTGTCCGGGCTAGAATTC	CAATAACCGACGCACCATGT
<i>fliE</i>	GTCTATTCAGGGTATCGACG	GTCCTGTTTCGTTGATTTT

Tableau 4 : Amorces de qPCR utilisées durant l'étude.

E) Analyses bio-informatique et statistique

La recherche de structures secondaires potentielles à l'intérieur des séquences transcrites des ARNm a été réalisée en utilisant le serveur « RNAfold » (<http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAfold.cgi>). La probabilité d'existence de ces structures est calculée par le serveur en tenant compte de la complémentarité des bases nucléotidiques et de la stabilité énergétique de la molécule.

D'une manière générale, le test de Student (*t* test) a été utilisé pour les analyses statistiques. Ce test de comparaison permet de savoir si la différence observée entre deux moyennes est réellement significative ou bien si elle est liée à une forte variance des échantillons. Lorsque la *Pvalue* obtenue est inférieure à 0,05, les deux moyennes sont dites « significativement différentes » : ceci signifie que la probabilité d'émettre une conclusion inexacte est inférieure à 5%.

3) Insertion de séquences *parS* dans le génome de *Dickeya dadantii*

A) Choix de la région à marquer

a. La séquence des gènes ainsi que leurs régions intergéniques ont été récupérés via la base de données ASAP (*Dickeya dadantii Erwinia chrysanthemi 3937 Genome Project*). Les insertions des séquences *parS* ont été effectuées dans des régions intergéniques de gènes

convergeants dans la mesure du possible, ces gènes correspondent à des gènes d'intérêts préalablement identifiés. Ainsi les insertions *parS* ne devraient pas induire d'effets transcriptionnel polaires indésirables.

b. Les amorces utilisées pour amplifier les gènes d'intérêt ont été dessinées grâce au logiciel primer 3. Les amorces ainsi dessinées ont été synthétisées via l'entreprise Eurofins. L'ensemble des amorces utilisées est présenté dans le tableau 5.

Gènes	Clonage	Sens	Anti-sens
<i>oriC</i>	TA cloning	TCCTGACCGGCATCCATAAC	TGAGTTTCCACCTGACCGAA
	Slic insertion <i>parS</i>	AGCCCTGAGATAAATCTCAGGGCTTT GGTTATATGGCCTTTGGCACCGGAG ATTGTGTAGGCTGGAGCTGC	CTATGGACGATACACCACGGGCTACAA CCCCAACAGGTATTCTCTACTAGGGTCT GCTATGTGGTGCTATCT
<i>ter</i>	TA cloning	CAGCGTCATGGGTTCAACAAG	GGCGTAATACTCCCGACGGAAC
	Slic insertion <i>parS</i>	CTTAGGTTTCTTGTTGATCGCTTGTCT TTGCGTTCCACATCCACTCAGTTGAT TGTGTAGGCTGGAGCTGC	CTAAATAGCCTCACATATTCGTAGAAAA ACTTTAGCGCCTGGAGTGTTGTTGGTCT GCTATGTGGTGCTATCT
<i>ousA</i>	TA cloning	GTGATGGCGTCAACCCTGCC	CCAGTTAGATATGGGGCTGC
	Slic insertion <i>parS</i>	GGCGGGTGCTGGCCCGTAACGCTT TTCTTTCTACCGCTGTTTTCTCTACCT GATTGTGTAGGCTGGAGCTGC	CGTCGACCCTCTGTTGACGGGCGTTTT GCATCAGCCTGGCAAGAAAAACCGGGT CTGCTATGTGGTGCTATCT
<i>fliT</i>	TA cloning	CATAGAAGTGAAGCCCTTC	GGCGTAGTTCGTTTGCTGC
	Slic insertion <i>parS</i>	CACAGCCCTTGCATACGAGCCCTGAC TTCCCCAAAAGGGGCTCTTTTATTC GATTGTGTAGGCTGGAGCTGC	GCACTTCGAGAAAAGGGTGAATAACCA TGTTTATTCACCCTGATTTTTTTGGGTCT GCTATGTGGTGCTATCT
<i>kdul</i>	TA cloning	GCTCGTTTCTACCGCAAGG	ACATCACCAGAGGGTAACGTT
	Slic insertion <i>parS</i>	AAAATGCCGGAGCGGTCTCCCCCTC CGGCATTTTTTGCCTCCGATTTTTCT AGGATTGTGTAGGCTGGAGCTGC	TCCAGAGTTGTCAGGAATATGACACCA ATCCGAACTTTGATCAGAGCGTGGTCT GCTATGTGGTGCTATCT
<i>cbrB</i>	TA cloning	TGTCCAGTTCTGGCGAGATT	CTATGTGTCGGAACCTGGCG
	Slic insertion <i>parS</i>	ACCTCAATGGACTGTAGGACATTCTA AAGAAATGAACACGCAACCTGACGG ATTGTGTAGGCTGGAGCTGC	AAAACCGATACTGGAAAACTTAACG TGGTGGCCAGTTTTTGTGACCAGGTCT GCTATGTGGTGCTATCT
<i>asr</i>	TA cloning	CTCCGGCTAAAGCTGCTGATACCG	TTATCGGTTTCGTAGCGCCAGCCG
	Slic insertion <i>parS</i>	AAAAGTGAAAAAAGCTAAGAAAGCC GCTACCCGGCAGCTTAATTCACCAG ATTGTGTAGGCTGGAGCTGC	TTGTCATGTCGGTAGTGGCTACCGGTGT TCATGACCATCACTATCACTTGGTCTG CTATGTGGTGCTATCT
<i>pggS</i>	TA cloning	GGTGGCATGCGATTTGTC	CAGCCGATATCAGAAAACGA
	Slic insertion <i>parS</i>	CTTGCAATCACCAACCAGAATCGCCA ACCACAGCGATTGTGTAGGCTGGAG CTGC	GAAACAGCTAAAAAATACAAAGAATTG ATGCCAGCGGTCTGCTATGTGGTGCTAT CT
<i>ahpCF</i>	TA cloning	GACCTATTGCCGCACTG	AGGAATCGGAAGCGTATCTG
	Slic insertion <i>parS</i>	TCTGCGCGGGTCCGAACCCTGTTCCA TCCTGTGGCCTGACCGGCCACTTTTCG GGCTGCTACCCTCATGCGTTGATTGT GTAGGCTGGAGCTGC	TGGGCTACCCGTAAAAAAACCCCTTCAG ACCAGTTGAAGGGGGTCTGGGTCGCCTG AAAGATCAGGTTGGTCTGCTATGTGGT GCTATCT

Tableau 5 : Amorce PCR utilisées durant l'étude.

B) Clonages des régions génomiques où seront insérés les sites *parS*

a. La première étape de construction des plasmides est l'amplification de la région génomique grâce aux amorces dessinées et à une ADN polymérase thermostable. La PCR est une méthode d'amplification *in vitro* de fragments d'ADN. Elle nécessite une paire d'oligonucléotide s'hybridant aux bornes de la séquence cible sur la matrice d'ADN. Ces oligonucléotides servent d'amorces à une ADN polymérase. Durant cette étude, deux ADN polymérases ont été utilisées : l'EmeraldAmp® Max PCR Master Mix (Takara) et la Primstar® High-Fidelity DNA Polymerase (New England Biolabs). L'Emerald® génère des extrémités protubérantes alors que la Primstar® est utilisée pour produire des extrémités à bouts francs. Dans certains cas, notamment pour vérifier les constructions génétiques, l'ADN contenu dans des colonies bactériennes est utilisé directement en association avec l'Emerald® qui est moins sensible à la présence d'impuretés.

b. Dans un second temps, l'amplicon est inséré dans le vecteur pGEM-T par la méthode dite de « TA cloning » (Zhou and Gomez-Sanchez, 2000) pour générer le plasmide pGEM-T-insert (figure 33).

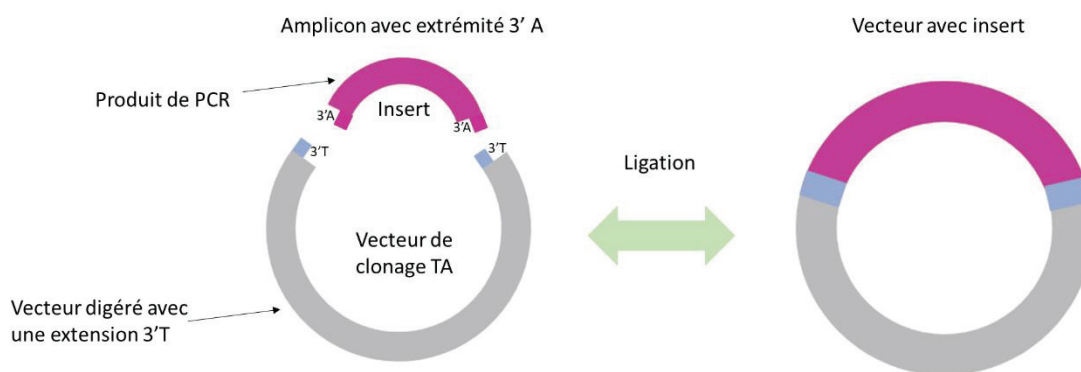


Figure 33 : TA Cloning. Lors d'une PCR réalisée avec l'EmeraldAmp, une adénine est ajoutée aux extrémités en 3' de chaque du produit de PCR. Il est alors possible de lier directement le produit PCR à l'aide d'une T4 DNA ligase dans un vecteur linéarisé dans lequel une thymine est ajoutée en 3' de chaque brin.

c. L'analyse des plasmides recombinants a été réalisée après extraction de l'ADN plasmidique par la méthode de la lyse alcaline (Birnboim and Doly, 1979). La purification est effectuée en utilisant le kit « plasmid DNA purification » commercialisé par Machery-Nagel (Duren-Germany).

C) Insertion des cassettes *parS*

a. Grâce à un clonage SLIC (Jeong et al., 2012), la séquence *parS* amplifiée est insérée au niveau d'un site unique de restriction présent dans la région du plasmide pGEM-T-*insert* construit précédemment. Cette technique repose sur l'activité 3'-5' exonucléase de la T4 DNA polymérase qui génère des extrémités 5' protubérantes. Le produit d'amplification doit comporter des extrémités homologues avec la région du plasmide dans laquelle il doit être cloné (figure 34). Ces séquences homologues sont portées par les amorces utilisées lors de l'amplification par PCR de la séquence d'intérêt. Le vecteur est linéarisé par simple digestion au niveau de la région d'insertion puis la T4 DNA polymérase est utilisée pour générer des extrémités cohésives à la fois sur le vecteur et le produit d'amplification. La T4 DNA polymérase est inactivée par 8 minutes d'incubation dans la glace et le mélange obtenu est utilisé pour réaliser la transformation de cellules compétentes de la souche *DH5α*. Puis, la séquence *parS* correspondante est amplifiée par PCR à partir du plasmide matrice pGBKD3-*parS* grâce aux amorces dessinées qui comportent une extension homologue au site d'insertion dans la région du gène. Le produit de la réaction est ensuite soumis à une digestion pendant 1h à 37°C par l'enzyme DpnI pour éliminer l'ADN matrice méthylé afin de ne conserver que le produit de PCR non méthylé. Les transformations des constructions plasmidiques ont été réalisées chez *E. coli DH5a* par la méthode au chlorure de calcium (CaCl_2).

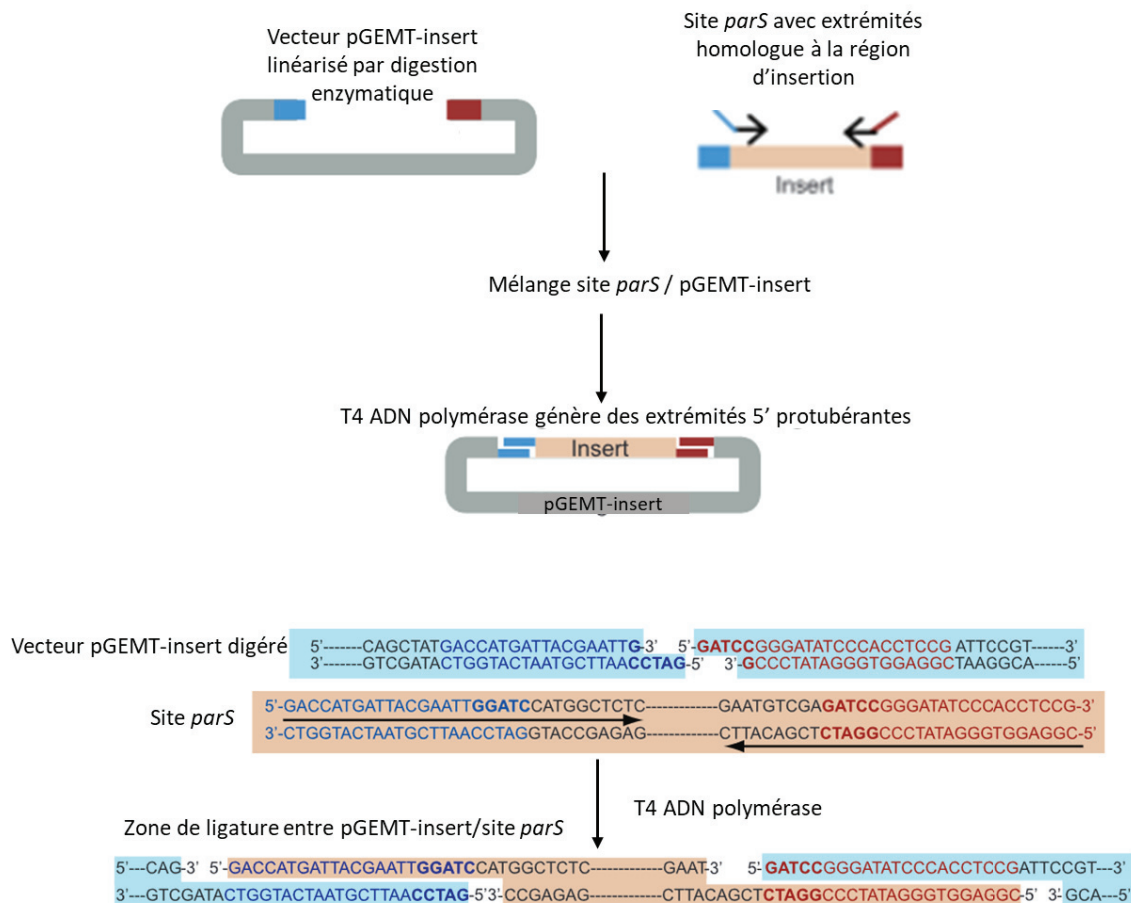


Figure 34 : Clonage slic (adaptation de la source : Jeong et al., 2012). L'insert *parS* possède à ses extrémités des séquences homologues au vecteur digéré. La T4 ADN polymérase génère des extrémités simple brin, elles sont cohésives entre le vecteur et l'insert *parS*. Ces séquences sont présentées en bas de la figure. Il y a hybridation entre les bases complémentaires. Le plasmide formé peut être transformé.

b. Certains plasmides d'insertion *parS* ont été construits grâce à la méthode de ligature. Cette technique repose sur l'activité de l'enzyme T4 DNA ligase qui permet de lier des fragments avec des extrémités cohésives ou franches. Le vecteur est linéarisé par digestion simple au niveau du site d'insertion puis le fragment *parS* amplifié par PCR est lié au vecteur grâce à la ligase. La ligature s'effectue pendant 24h à une température de 15°C (température optimale d'activité pour la T4 DNA ligase). Puis le mélange obtenu est utilisé pour réaliser la transformation de cellules compétentes de la souche *DH5α*.

c. Les plasmides permettant le marquage des gènes d'intérêt grâce au système *parS*/ParB sont des produits de deux clonages successifs. Le premier permet l'insertion de la région chromosomique d'intérêt dans le vecteur pGEMT et le second l'intégration de la séquence *parS* choisie pour effectuer le marquage dans le génome de *D.dadantii*. Les séquences *parS*

sont associés à des gènes de résistance à différents antibiotiques ce que permet la sélection des bactéries transformées après le clonage. La séquences *parSP1* est associée à un gène de résistance à la rifampicine et la séquence *parSpMT1*, à un gène de résistance au chloramphénicol. Les constructions ont été réalisées chez *E. coli DH5α* avant d'être transférées dans *D. dadantii* 3937 (A4922) via une électroporation réalisée à l'aide du Electroporator 2510 (Eppendorf®). Des aliquots de 50µL de bactéries électrocompétentes sont transformées avec 100ng des différents plasmides puis placées en culture d'expression à 30°C pendant 1h30. Ces bactéries sont par la suite sélectionnées sur milieu riche LB (Luria Bertani) en présence de l'antibiotique adéquat. Après 48h d'incubation à l'étuve à 30°C, les transformants sont soumis à une analyse phénotypique de résistance aux antibiotiques. En cas de résultats conformes, les expériences de recombinaison homologue sont mises en œuvre.

d. Les transformants validés sont mis en culture dans un milieu nutritionnel carencé en phosphate additionné de glucose à une concentration finale de 2 g/L (V/V) et de l'antibiotique adéquat. Les cultures sont incubées à 30°C avec une agitation continue de 250rpm puis réensemencées quotidiennement en utilisant les cultures du jour précédent. La faiblesse nutritive du milieu et la pression de sélection constante par l'antibiotique favorisent l'intégration de la cassette de résistance dans le chromosome par recombinaison homologue. Lorsque cet événement est réalisé, la conservation du plasmide devient inutile et sa perte est facilitée lors de la division cellulaire. Afin de sélectionner et d'identifier les cellules qui ont subi la recombinaison tout en ayant perdu le plasmide, un volume de 100 µL d'une culture de nuit diluée de manière appropriée (généralement 10⁵ ou 10⁶ fois) est étalé sur un milieu solide contenant l'antibiotique adéquat. Après une incubation de 24 à 48 heures à 30°C, les colonies isolées sont répliquées parallèlement sur deux milieux solides additionnés pour l'un de l'antibiotique associé à la construction et pour l'autre de l'antibiotique dont la résistance est portée par le plasmide. Après une incubation de 24 heures à 30°C, la présence de colonies qui se multiplient en présence de l'antibiotique associé à la construction et qui ne se multiplient pas en présence de l'antibiotique porté par le plasmide est recherchée (figure 35). Ces colonies sont isolées et analysées par une réaction de PCR encadrant le site d'insertion afin de vérifier la présence de la cassette au niveau de la région chromosomique à étudier. Par la suite, la technique de transduction par le phage φEC2 décrite par Résibois et al., (1984) et détaillée dans la section ci-dessus, a été utilisée afin de transférer la mutation obtenue dans le génome

de la souche que l'on désire modifier. Cette dernière étape a pour but de se débarrasser des erreurs de réplication potentielles retenues dans le génome de la souche recombinante lors des cultures successives en milieu bas phosphate.

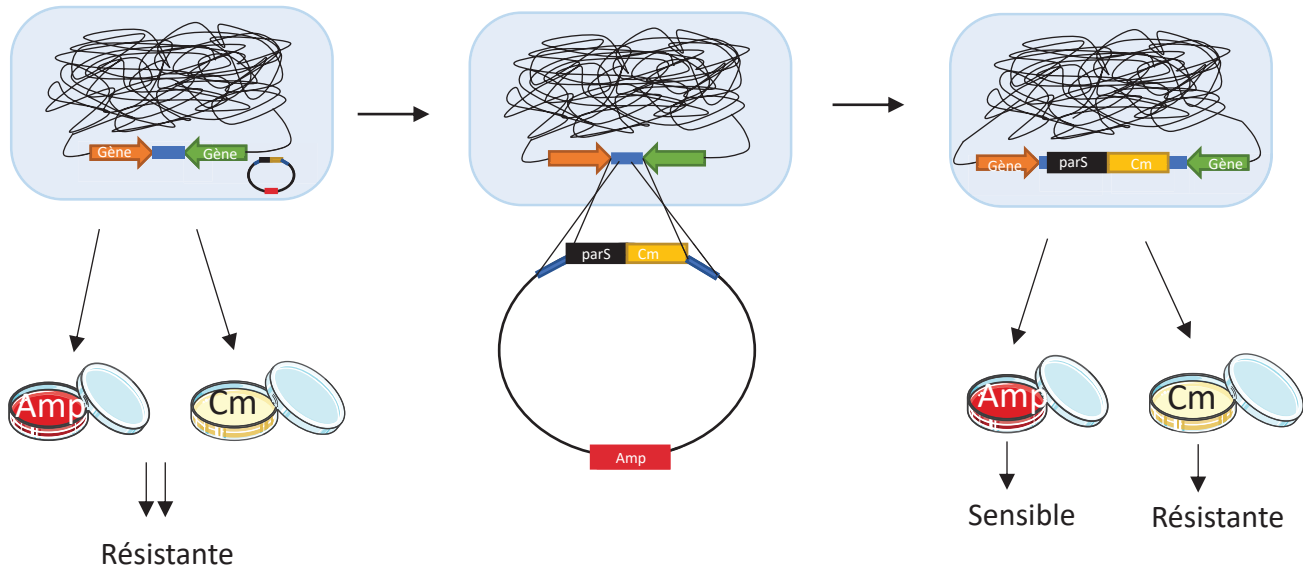


Figure 35 : Protocole de recombinaison en milieu bas phosphate. L'appauvrissement en phosphate du milieu force l'insertion de la cassette du plasmide dans le chromosome de la bactérie. Le gène de résistance à l'antibiotique intégré dans l'insert permet de sélectionner les bactéries ayant intégré la cassette. Ici est représenté l'exemple d'un insert *parSpMT1* avec un gène de résistance au chloramphénicol.

e. Après insertion l'ensemble des constructions génétiques est contrôlé grâce à une PCR sur colonie, afin de vérifier la taille du fragment cloné et l'insertion du site *parS*. Les produits d'amplifications sont analysés par électrophorèse sur gel d'agarose. Les concentrations des gels réalisés s'établissent entre 0,7 à 1,5% d'agarose dans un tampon TAE (Tris Acétate EDTA : 40 mM Tris acétate et 1 mM EDTA). Après migration, les acides nucléiques sont colorés par immersion dans un bain de BrET à 0,5 µg/mL (Bromure d'Ethidium). Les souches ayant correctement intégrées les fragments sont conservées à -80°C dans du glycérol à 40% (V/V).

D) Construction de souches portant un double étiquetage

La transduction généralisée consiste en un transfert de matériel génétique d'une bactérie donneuse à une bactérie receveuse, par l'intermédiaire d'un bactériophage, ici le

phage Φ EC2 (Resibois et al., 1984) selon la méthode précédemment décrite. Des stocks de phages Φ EC2 sont réalisés sur les souches comportant un étiquetage simple *parSP1* ou *parSpMT1*, obtenues par recombinaison homologue. Ces lysats de phages sont utilisés pour construire les transductants avec un double étiquetage *parSP1* et *parSpMT1* par infection croisée. Les transductants résistants à la fois à l'antibiotique de la donneuse et de la receveuse sont ensuite analysés par PCR sur colonie suivie d'une électrophorèse sur gel d'agarose. Les souches ayant correctement intégrées les fragments sont conservées à -80°C dans du glycérol à 40% (V/V).

4) Mise au point des conditions de cultures optimales pour la visualisation des cellules en microscopie

A) Obtention de bactéries fluorescentes

a. Les souches de *D. dadantii* possédant les doubles insertions *parS* ont été transformées avec le plasmide p2973 codant deux protéines ParB. La protéine ParB-MT1 se fixant au site *parSpMT1* est fusionnée à la GFP alors que la protéine ParB-P1 se fixant au site *parSP1* est fusionnée à la RFP-mCherry. Ceci permet d'observer le positionnement cellulaire des loci chromosomiques étiquetés sous forme de spots de fluorescence de couleur vert ou rouge, respectivement.

b. Le nucléoïde des bactéries est observé grâce à un marquage au Dapi (4,6-diamidino-2-phénylindole). Après avoir été cultivées selon les protocoles décrits ci-après les cellules sont incubées 20min avec du Dapi à une concentration 5 μ g/mL. Puis les cellules sont observées au microscope à fluorescence.

B) Mise au point des conditions de cultures et variations

a. L'observation des loci chromosomiques étiquetés a été effectuée en microscopie optique à fluorescence sur des bactéries vivantes (Lesterlin and Duabry, 2016). Les souches sont cultivées à 30°C sur une nuit en milieu riche RDM EZ Rich Medium (Takara) additionné de

saccharose 0.2% (W/V) et d'ampicilline 100ug/mL pour maintenir le plasmide p2973. Le matin de l'expérience, une culture estensemencée sans antibiotique à partir de la pré-culture et la croissance est suivie jusqu'à une Densité Optique (D.O) de 0,3-0,4 à 600 nm.

b. En accord avec nos données transcriptomique, les cultures ont été effectuées par la suite en milieu minimum M63. De la même façon, les souches sont cultivées à 30°C sur une nuit en milieu minimum M63 additionné de saccharose 0.2% (W/V), de MgSO₄ 1mM et de vitamine B1 0,05% ainsi que d'ampicilline 100ug/mL pour maintenir le plasmide p2973. Le matin de l'expérience, une culture estensemencée sans antibiotique à partir de la pré-culture et la croissance est suivie jusqu'à une Densité Optique (D.O) de 0,3-0,4 à 600 nm.

c. Dans un premier temps les cellules sont observées dans des conditions standard de croissance, les bactéries sont ensuite soumises à différents stress environnementaux. Dans le cas d'un stress osmotique, les bactéries sont cultivées en présence d'une concentration finale en NaCl de 0,3 M, dans le cas d'un stress oxydant en présence de H₂O₂ 100 µM et enfin dans le cas d'un stress acide à pH 5 en présence d'acide malique 36 mM.

C) Stabilité plasmidique chez *Dickeya dadantii*

a. Lors de l'étude divers vecteurs de transformation ont été utilisés avec des fonds génétiques différents afin d'identifier le plasmide présentant la plus forte stabilité chez *D. dadantii*. Les plasmides testés sont les suivants : p2973 (plasmide traditionnel utilisé dans le système *parS*/*ParB* inductible à l'IPTG et possédant un gène de résistance à l'ampicilline), le pWSK29 (plasmide à faible nombre de copie possédant un gène de résistance à l'ampicilline), le pWSK130 (plasmide à faible nombre de copie possédant un gène de résistance à la kanamycine) et le pBBRpBAD (plasmide à faible nombre de copie, inductible à l'arabinose et possédant un gène de résistance à l'ampicilline). Dans un premier temps les bactéries ont été transformées avec les différents vecteurs, puis mis en culture dans les conditions de l'observation microscopique et étalées sur le milieu sélectif approprié. Des comptages des bactéries sur des milieux sélectifs et non sélectifs ont été réalisés afin de déterminer la proportion de bactérie ayant conservées le plasmide après les cultures.

b. Grâce à un clonage Teda (Xin et al., 2018), la séquence ParB-SP1 fusionnée à la RFP et la séquence ParB-SMT1 fusionnée à la GFP ont été transféré du vecteur p2973 au pBBRpBAD, à nombre de copie par cellule relativement faible. Cette technique repose sur l'activité 3'-5' exonucléase de la T5 DNA polymérase qui génère des extrémités 3' protubérantes. Le produit d'amplification qui est inséré dans le vecteur doit posséder des extrémités homologues avec la région du plasmide dans laquelle il sera cloné. Le vecteur est linéarisé par digestion au niveau de la région d'insertion puis la T5 DNA polymérase est utilisée pour générer des extrémités cohésives à la fois sur le vecteur et le produit d'amplification à insérer. La T5 DNA polymérase est inactivée par incubation dans la glace et le mélange obtenu est utilisé pour réaliser la transformation de cellules compétentes de la souche *DH5α* (figure 36).

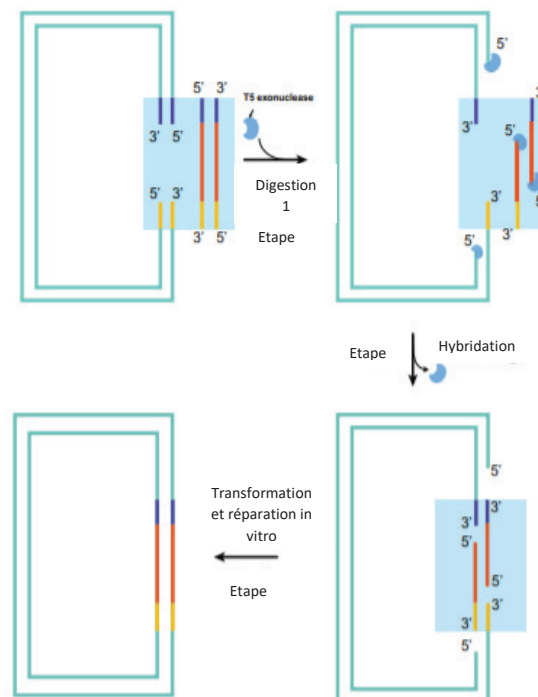


Figure 36 : Clonage Teda. La T5 ADN polymérase génère des extrémités 3' protubérante sur l'insert et sur le vecteur qui vont s'aligner par homologie. La transformation et ligature ont lieu dans les cellules.

D) Impact des insertions *parS* sur la bactérie

a. Pour réaliser des cinétiques de croissance les cellules sont incubées une nuit à 30°C en RDM ou milieu minimum M63 additionné de saccharose 0.2 % (W/V), de MgSO₄ 1mM et de

vitamine B1 0,05%. Puis les cultures sont diluées à une D.O₆₀₀ 0,1 et mis en incubation dans 150uL de milieu frais, les inoculums sont ainsi déposés dans des plaques 96 puits à fond clair afin de permettre la lecture de D.O à 600nm grâce au lecteur de plaque « Tecan Spark ». Les cinétiques sont réalisées avec agitation orbital pendant 300sec et mesure des D.O toutes les 5minutes pendant 10h. La croissance des cellules est mesurée dans la condition standard et dans les diverses conditions de stress : stress osmotique médié par la présence de NaCl à 0,3M, stress oxydant en présence d'H₂O₂ à 100uM, stress acide par la présence d'acide malique à 36mM (correspondant à un pH 5) et stress à la novobiocine à 100ug/mL.

b. L'impact des insertions *parS* et de la fixation des protéines ParB sur l'expression des gènes voisins a aussi été analysé par RT-qPCR les ARNs ont été extraits, convertis en ADNc et quantifié par la qPCR en temps comme précédemment décrit.

5) Analyses des mutants des protéines associées au nucléoïde

A) Construction des mutants NAPs

a. Les souches mutées pour les protéines NAPs font partie de la collection du laboratoire ; elles ont été obtenues par inactivation de la région codante des gènes via l'introduction de cassettes comportant un gène codant une protéine de résistance à un antibiotique et des terminateurs forts de la transcription aux deux extrémités.

b. Le transfert des sites *parS* dans les mutants NAPs a été réalisé via la méthode de transduction généralisé décrite précédemment.

c. Les cellules ont été misent en cultures en milieu minimum M63 selon le protocole décrit précédemment.

6) Microscopie fluorescente à haute résolution

A) Visualisation des spots de fluorescence sur cellule vivante en direct

a. Pour l'observation les bactéries sont déposées sur une lame comportant de l'agarose 1% et de milieu de culture identique à celui utilisé pour la culture, selon la méthode décrite par (Lesterlin and Duabrry, 2016), (figure 37). Les lames contenant les cellules vivantes sur agar sont placées entre lame et lamelle ou dans un système de microfluidie (CellAsic) et sont maintenues tout au long des acquisitions à 30°C dans l'enceinte thermostatée du microscope.

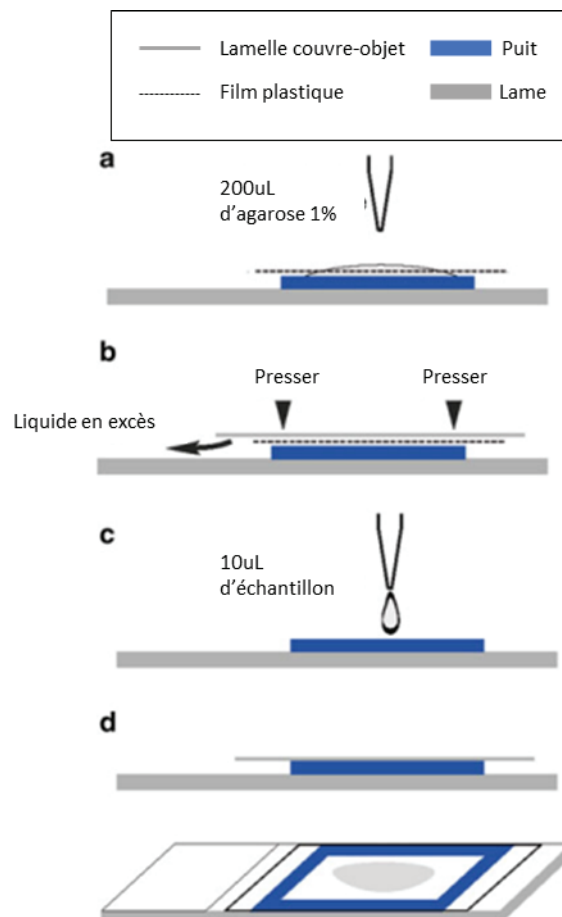


Figure 37 : Montage des lames sur coussin d'agar (adaptation de la source Lesterlin and Duabrry, 2016). L'agar est coulé dans un puit siliconé avant d'être recouvert d'une lamelle pour séchage. Ensuite l'échantillon est déposé sur le puit d'agar avant d'être recouvert d'une lamelle pour être observé au microscope à fluorescence.

b. La microscopie à fluorescence est réalisée avec le microscope Eclipse Ti-E (Nikon) équipé d'un objectif x100/1.45 oil Plan Apo Lambda phase et d'une caméra Flash4 V2 CMOS (Hamamastu). Le logiciel d'acquisition des images est le programme NIS. Les images sont réalisées avec les filtres Fluo LED SPectra X light aux longueurs d'onde comprise entre 488 et 560nm.

B) Analyses d'images

L'analyse automatique des images a été effectuée à l'aide du logiciel Fiji et de son extension MicroBJ (Ducret et al., 2016). Ce logiciel permet dans un premier temps de compter le nombre de cellules, de déterminer leur dimension et de les distinguer des amas cellulaires pouvant biaiser l'analyse de la fluorescence. Un second volet du logiciel permet de détecter les spots de fluorescence de chaque cellule de manière automatique et de les localiser sur les axes transversal (du centre à la périphérie), longitudinal (de pôle à pôle) de la cellule et de façon dite « cylindrique » (de cœur vers la périphérie). Lors de l'analyse des données dans les axes transversaux et longitudinaux la distribution spatiale des loci dans la longueur et la largeur de la cellule est extraite puis une transformation linéaire à lieu. Alors que lors de l'analyse dite « cylindrique » des cellules, le nucléoïde est découpé en 4 espaces de volume équivalent du cœur vers la périphérie et les distributions spatiales des loci sont mesurées dans chaque espace. Des graphiques sont générés en mesurant la proportion de spots de fluorescence dans chacun de ces espaces (figure 38).

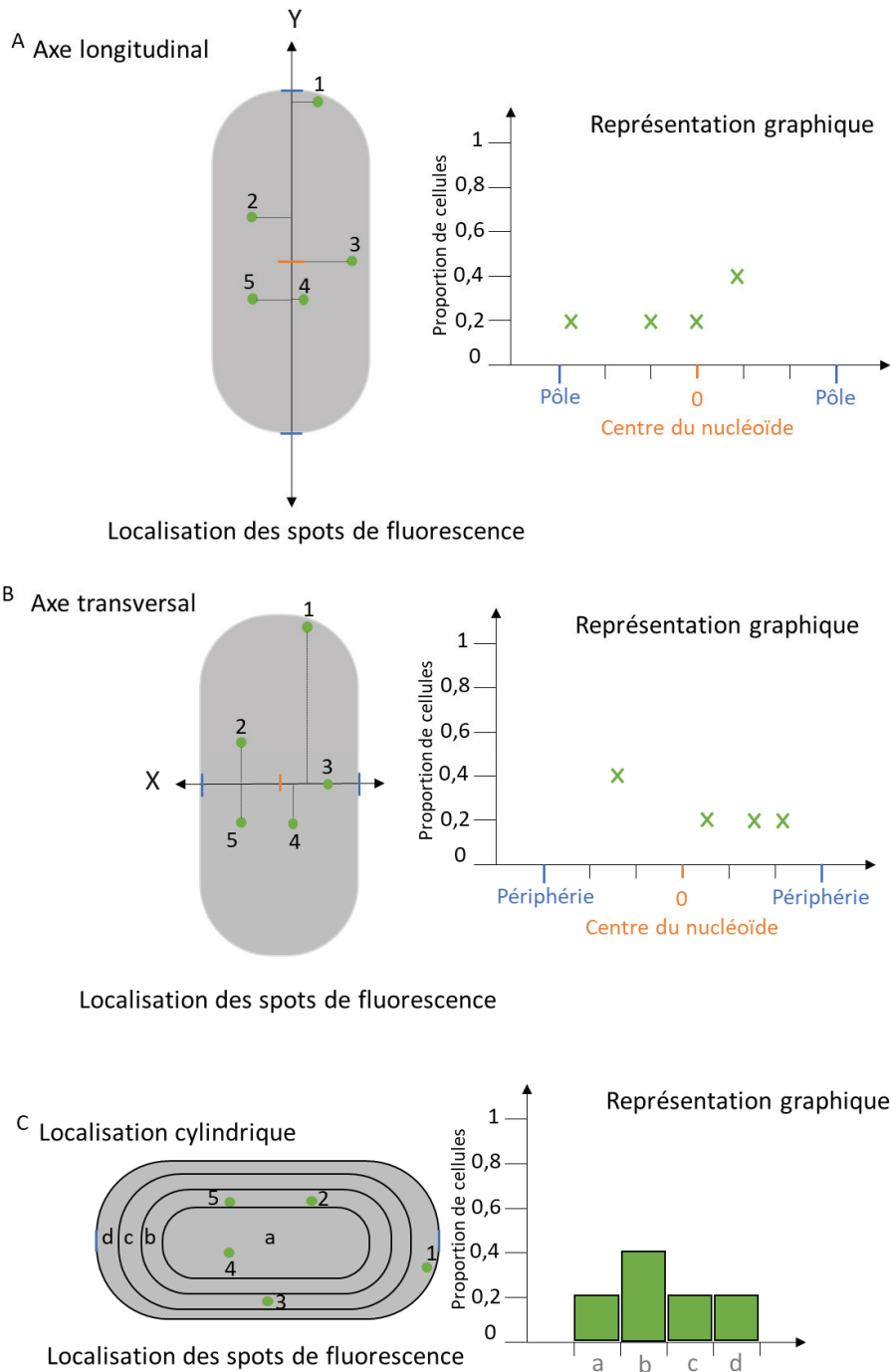


Figure 38 : Représentation schématique de la localisation des spots de fluorescence. L'extension MicroBJ du logiciel ImageJ permet la localisation des spots de fluorescence dans les différents axes de la cellule. Dans l'axe longitudinal du centre vers les pôles de la cellule, les spots sont localisés et leurs positions est rapporté sur l'axe x. Le zéro étant le centre du nucléoïde on peut ainsi déterminer si les spots de fluorescence sont plus ou moins proche des pôles du nucléoïde (A). Dans l'axe transversal du cœur vers la périphérie de la cellule, les spots sont localisés et leurs positions est rapportée sur l'axe y. Le zéro étant le cœur du nucléoïde on peut ainsi déterminer si les spots de fluorescence sont plus ou moins proche de la périphérie du nucléoïde (B). Dans une relocalisation dite « cylindrique », où le nucléoïde est découpé en 4 espaces de volume équivalent noté de a à d du cœur vers la périphérie. Le logiciel détecte ensuite les spots présents dans chaque espace ce qui nous permet de déterminer avec précision la localisation des spots de fluorescence dans la cellule.

Partie III : Résultats

1) Stratégie retenue pour la construction des souches dédiées à la visualisation de la dynamique du chromosome en temps réel

Comme précédemment indiqué, nous avons retenu une stratégie couplant des approches de génétique moléculaire et de microscopie à haute résolution, permettant de réaliser des investigations sur des cellules vivantes, pour satisfaire les objectifs de mon projet de thèse. Ainsi, ont été marqués spécifiquement différents *loci* du chromosome de *D. dadantii* localisés à proximité de gènes marqueurs, afin de suivre la dynamique de leur localisation dans la cellule en fonction des conditions environnementales. Nous avons utilisé les spécificités fonctionnelles du système *parS*/ParB pour marquer les différents loci retenus. L'introduction d'une séquence *parS* (20 à 80 pb) au sein d'un locus chromosomique permet sa visualisation grâce à la protéine ParB couplée à un marqueur fluorescent de type GFP (Green Fluorescent Protein) ou RFP (Red Fluorescent Protein). En effet, cette protéine hybride ParB-GFP ou ParB-RFP se fixe de manière coopérative et spécifique sur la séquence *parS* correspondante pour former un spot de nucléation. Plusieurs protéines ParB se fixent sur la séquence *parS* et ainsi il y a une amplification de la fluorescence émise et par conséquent une augmentation de la fluorescence et de la résolution des observations au microscope (Dabrazhynetskaya et al., 2009), (figure 39).

Les systèmes *parS*-ParAB sont des systèmes de partition de plasmides ou de phages répliquatifs lors des étapes de division cellulaire. La protéine ParA dotée d'une activité ATPase se complexe à la protéine ParB fixée sur le site *parS* présent au sein des plasmides ou de l'ADN phagique et permet leur ségrégation dans chaque cellule fille. En absence de la protéine ParA, le complexe *parS*-ParB se forme mais la ségrégation n'a pas lieu. Chaque système *parS*-ParAB est spécifique d'un plasmide ou d'un phage particulier et n'est pas interchangeable avec un autre système (Dabrazhynetskaya et al., 2009). Il est ainsi possible de suivre la dynamique de deux loci distincts au sein d'une même cellule en utilisant deux systèmes *parS*-ParB différents pour peu que chacune des protéines ParB soit couplée à un marqueur fluorescent (GFP ou RFP).

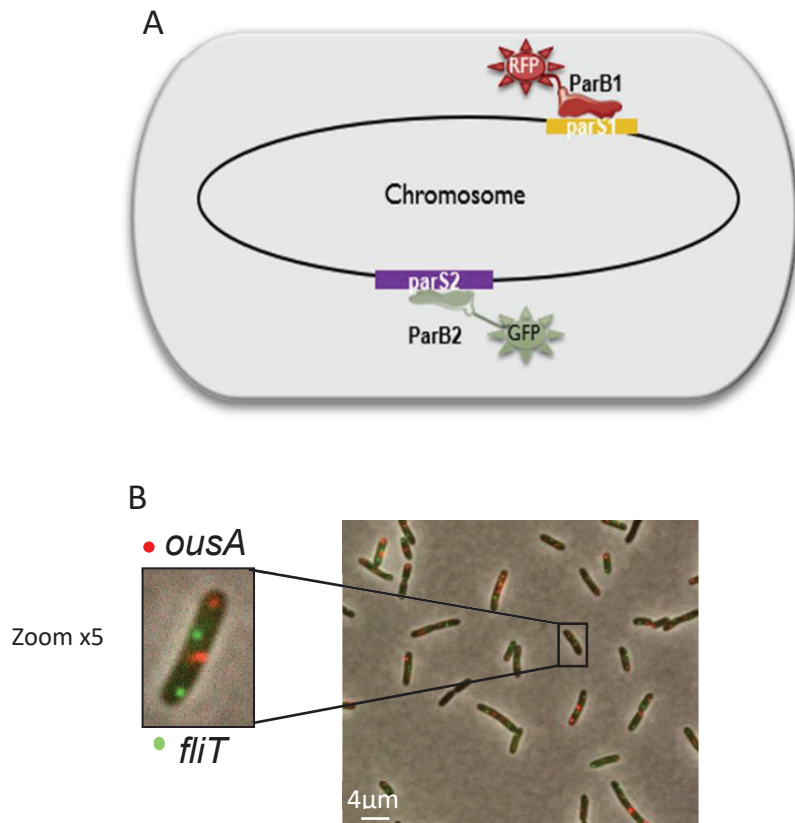


Figure 39 : Schéma représentant la méthode de marquage reposant sur l'utilisation du système *parS*/ParB. La séquence d'ADN *parS* est intégrée artificiellement à proximité des loci d'intérêt et est révélée grâce à la fixation sur cette séquence *parS* de la protéine ParB correspondante couplée à une protéine fluorescente soit GFP pour une fluorescence verte soit RFP pour une fluorescence rouge (A). La liaison ParB/*parS* forme un spot de fluorescence observable en microscopie à fluorescence à haute résolution. Il existe différentes séquences *parS* reconnues par des protéines ParB spécifiques, il est ainsi possible en les couplant à des protéines fluorescentes différentes d'effectuer des doubles marquages comme pour le double mutant *ousA/fliT* où le loci *ousA* est marqué à la RFP alors que *fliT* est marqué à la GFP (B).

La stratégie consiste à insérer deux types de sites *parSP1* et *parSpMT1*, issus respectivement du bactériophage P1 et du plasmide pMT1 afin de réaliser des doubles marquages. Chez *D. dadantii*, il n'existe pas de site *parS* naturel, ni de protéine ParB, la ségrégation du chromosome est contrôlée par la topoisomérase IV constituée des deux sous unités ParE-ParC. Il n'y a donc pas d'interférences avec les sites *parS* introduits artificiellement dans le génome. Le choix des sites d'insertion *parS* a été dicté par la proximité de gènes impliqués dans la virulence ou les processus adaptatifs. Ces sites *parS* ont été introduits dans des régions inter-géniques au niveau de gènes convergents dans la mesure du possible de façon à n'inactiver aucun gène et d'éviter autant que faire se peut des actions polaires sur

l'expression des gènes voisins. Les loci sélectionnés sont indiqués sur la figure 40 et décrite dans le tableau 6.

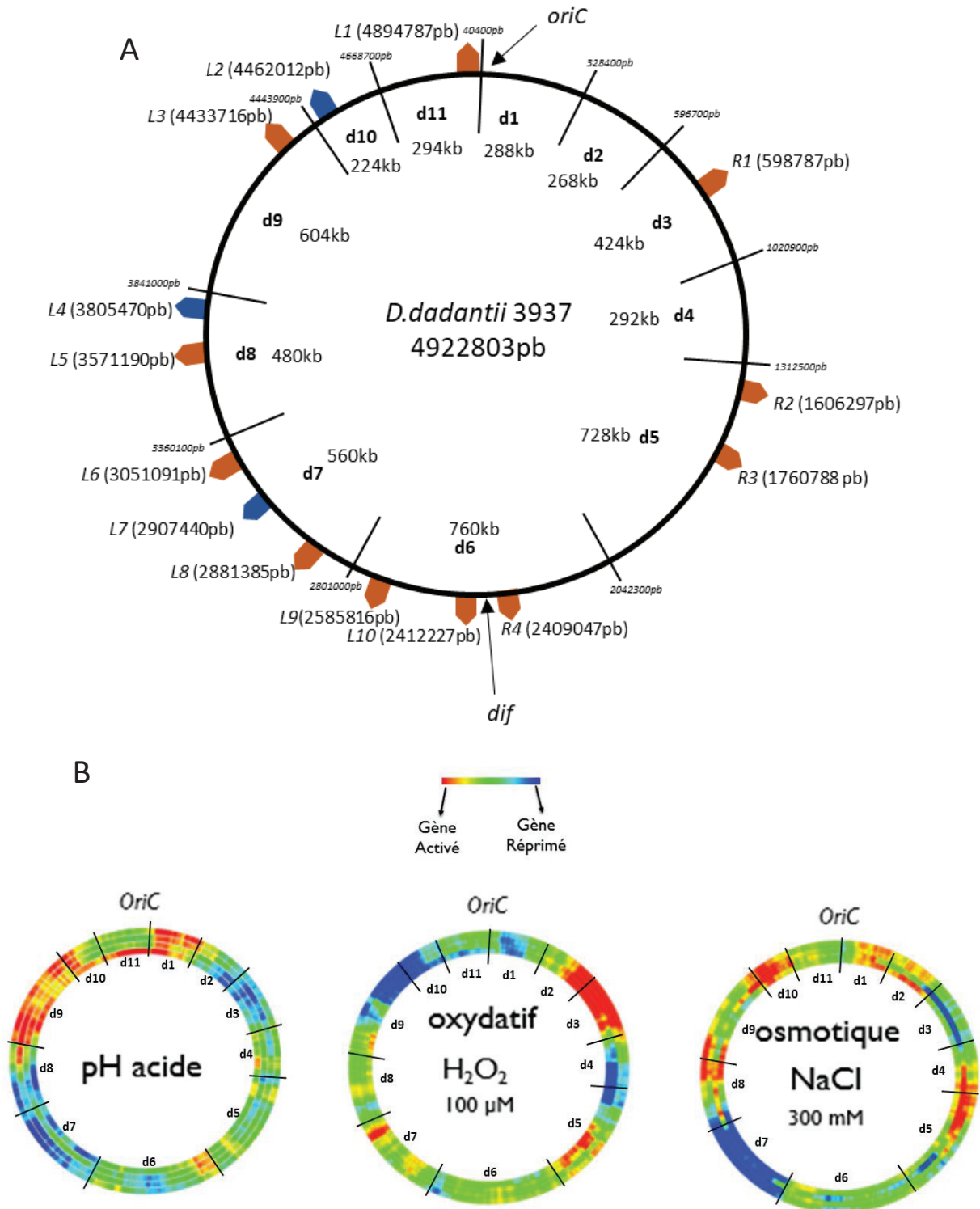


Figure 40 : Organisation des différents domaines d'expression cohérents (CODOs) de *D. dadantii* et localisation des différents sites d'insertion *parS*. Le chromosome de *D. dadantii* est organisé en onze domaines : d1 (40400-328400pb), d2 (328400-596700pb), d3 (596700-1020900pb), d4 (1020900-1312500pb), d5 (1312500-2042300pb), d6 (2042300-2801000pb), d7 (2801000-3360100pb), d8 (3360100-3841000pb), d9 (3841000-

4443900pb), d10 (4443900-4668700pb) et d11 (4668700-40400pb). L'*origine* est localisée dans le domaine d11 (244pb) entre les positions 4922568 et 8pb. L'insertion L1 est localisée à 27781pb de l'origine dans le réplicore gauche. Le site *dif* (28pb) qui correspond au *terminus* de réplication est localisé dans domaine d6 entre les positions 2411972 et 2411999pb. L'insertion L10 est localisée à 228pb de *dif* dans le réplicore gauche. La position des étiquettes *parS* le long du chromosome est décrite sur la figure, les étiquettes bleues correspondent à des insertions *parS* n'ayant pas abouti durant la thèse. (A), au centre les domaines chromosomiques sont délimités par les lignes noires. Les insertions *parS* ont été effectuées dans la mesure du possible au voisinage de gène présent dans les différents domaines du chromosome et ont des niveaux d'expression qui varient en fonction des conditions de stress (B). Les densitomètres montrent l'expression globale des domaines du chromosome. Les régions bleues correspondent aux régions présentant une forte densité de gènes réprimés alors que les régions rouges correspondent à des régions présentant une forte densité de gènes exprimés.

Insertion	Position	Gène avoisinant (distance insertion)	Etiquette	Stress d'intérêt	Expression en condition de stress	Domaine	Expression global du domaine
R1	598787pb	ahpCF (39pb)	parSpMT1	Oxydant	Induit	d3	Fortement induit
R2	1606297pb	ousA (121pb)	parSP1	Osmotique	Induit	d5	Réprimé
R3	1760788pb	cbrB (6894pb)	parSpMT1	Oxydant	Réprimé	d5	Induit
R4	2409047pb	pggS (467pb)	parSP1	Oxydant	Induit	d6	Réprimé
L10	2412227pb	dif (208pb)	parSP1	Contrôle	-	d6	-
L9	2585816pb	kduI (1221pb)	parSP1	Oxydant et pectine	Induit	d6	Réprimé
L8	2881385pb	asr (585pb)	parSpMT1	Acide	Exprimé	d7	Fortement réprimé
L7	2907440pb	sufA (100pb)	Non aboutit	Oxydant	Induit	d7	Réprimé
L6	3051091pb	fliT (49pb)	parSpMT1	Osmotique Oxydant	Réprimé	d7	Fortement réprimé Réprimé
L5	3571190pb	pelA (2680pb)	parSpMT1	Pectine	Induit	d8	-
L4	3805470pb	proV (56pb)	Non aboutit	Osmotique	Induit	d9	Réprimé
L3	4433716pb	pelB (140pb)	parSP1	Pectine	Induit	d9	-
L2	4462012pb	envZ (25pb)	Non aboutit	Acide	Induit	d10	Induit
L1	4894787pb	origine (27781pb)	parSpMT1	Contrôle	-	d11	-

Tableau 6 : Voisinage des insertions *parS*. Les insertions *parS* ont été effectuée au voisinage de gènes présent dans les différents domaines du chromosome et ont des niveaux d'expression qui varient en fonction des conditions rencontrées durant la pathogénèse. Les lignes en orange correspondent aux constructions exploitées durant l'étude et les lignes en bleues les constructions n'ayant pas abouti.

Comme précédemment indiqué dans la partie bibliographique, *D. dadantii* est confrontée à des environnements changeant durant le processus infectieux. Parmi ces conditions, les stress acide, osmotique et oxydant représentent des défis auquel la bactérie doit faire face en mettant en œuvre différents processus dont des reprogrammations

génétiques. Les Pels en dégradant la pectine présente dans la paroi végétale fournissent l'énergie requise à *D. dadantii* pour une croissance active in planta ; ces enzymes sont donc indispensables pour la « fitness » de *D. dadantii* in planta. Lors de la pénétration des bactéries dans les espaces intercellulaires de la plante dont le pH est proche de 4, elles subissent un premier stress acide. Lors de la phase de colonisation de la plante par les bactéries, la plante met en œuvre des réactions de défense en produisant notamment des espèces réactives de l'oxygène (ROS), ce qui engendre un stress oxydant pour les bactéries. Enfin durant la phase de macération des tissus végétaux, il y a relargage des contenus vacuolaires, ce qui engendre un stress osmotique pour les bactéries.

Les gènes utilisés dans les différentes expériences sont impliqués dans l'acclimatation des bactéries ou la virulence. Leurs fonctions dans les divers processus sont présentées ci-après.

A) Réplication du chromosome

La réplication du chromosome est initiée au niveau du locus *oriC* et se termine au niveau du site *dif* au sein du locus *ter*. Ces deux loci ont été choisis afin de visualiser la chorégraphie cellulaire du chromosome lors de la réplication mais aussi pour servir de contrôle d'appréciation de la spécificité des réactions des différents loci aux variations des conditions de croissance.

B) Dégradation de la pectine

Pour étudier l'induction par la pectine et la réponse aux stress environnementaux, les gènes *pelB* et *pelA* ont été sélectionnés. Ils codent deux des cinq pectate lyases majeures, enzymes extracellulaire agissant sur la pectine, ciment de la paroi des cellules végétales ; les Pels sont considérés comme le facteur de virulence principal des bactéries du genre *Dickeya*. L'expression des deux gènes est relativement peu sensible aux stress environnementaux. En revanche le gène *pelA* est induit par le stress acide. Le gène *kdul* codant pour une isomérase cytoplasmique impliquée dans le catabolisme de la pectine a également été utilisé comme

marqueur (figure 41). Les gènes sont localisés dans des domaines chromosomiques différents : d6 pour *kduI*, d8 pour *pelA* et d9 pour *pelB* (tableau 6).

C) Mobilité

Le gène *fliT* code une protéine chaperonne cytoplasmique qui interagit avec la protéine flagellaire FliD et prévient son agrégation dans le cytoplasme avant son exportation à travers l'anneau d'ancrage du flagelle. Il est donc impliqué dans la mobilité bactérienne. Ce gène est induit en condition de stress oxydant et réprimé en stress osmotique. Il est localisé dans le domaine chromosomique d7.

D) Les marqueurs du stress osmotique

Globalement, le stress osmotique induit une synthèse de novo des systèmes de transport des ions et des osmoprotectants, des solutés compatibles afin de rétablir un état d'équilibre physiologique en ajustant la composition et la concentration des solutés internes, le métabolisme énergétique, la croissance et la division cellulaire. Les gènes des transporteurs d'osmoprotectants *ousA* (équivalent de ProP d'*E. coli*), responsable de l'absorption de la glycine, de la bétaine, de la proline, de l'ectoïne et de l'acide pipécolique (Gouesbet et al., 1996), et *ousB* (OusVWX, équivalent à *E.coli* ProVWX), responsable de l'absorption de la glycine bétaine et de la choline (Choquet et al., 2005) sont fortement induit en condition de stress osmotique (d'environ 70 fois pour *ousB* quelle que soit la phase de croissance et de 45 fois et plus de 100 fois pour *ousA* en phase exponentielle et stationnaire, respectivement). En l'absence d'osmoprotectants dans l'environnement, *D. dadantii* favorise l'accumulation de glutamine, de glutamate et d' α -glucosylglycérate, un osmolyte ionique également présent chez certaines archées halophiles (Goude et al., 2004). La synthèse de l' α -glucosylglycérate est catalysée par la glucosyltransférase PggS, qui condense l'ADP-Glucose avec le D-3-phosphoglycérate. L'intermédiaire phosphorylé résultant est ensuite converti en glucosylglycérate par l'action de la phosphatase PggP. L'opéron *pggS-pggP*, impliqué dans la biosynthèse de l' α -glucosylglycérate et l'opéron *betABI*, permettant la synthèse de la glycine

bétaïne à partir de la choline, sont activés par le stress osmotique. Enfin le gène *peIA* dont l'expression est sensiblement réprimée par le stress osmotique a été utilisé en complément de *ousA* et *pggS* (figure 41). Le gène *ousA* est localisé dans le domaine d5 et *pggS* dans le domaine d6.

E) Les marqueurs du stress oxydant

L'opéron *ahpCF* codant une peroxydase qui réduit l'hydroperoxyde organique en alcool, est l'un des opérons de *D. dadantii* le plus fortement induit par le stress oxydant. Les gènes *peIA* est réprimé alors que *kdul* est induit par le stress oxydant, ils ont été utilisés comme marqueurs additionnels pour ce stress. Le gène *ahpC* est localisé dans le domaine d3 et le gène *kdul* est localisé dans le domaine d6.

F) Les marqueurs du stress acide

Une forte induction du gène *asr* codant pour une protéine périplasmique inductible à l'acide a été observée. En effet, la protéine *Asr* contient un nombre élevé d'acide aminés basiques, de sorte qu'elle peut servir de chaperon, protégeant les protéines en séquestrant les protons. Ce gène a donc été utilisé comme marqueur du stress acide et est localisé dans le domaine d7 bien que ce domaine soit plutôt réprimé par le stress acide.

L'ensemble des données de transcriptomique montrant l'expression des gènes étudiés en fonction des conditions est présenté dans la figure 42.

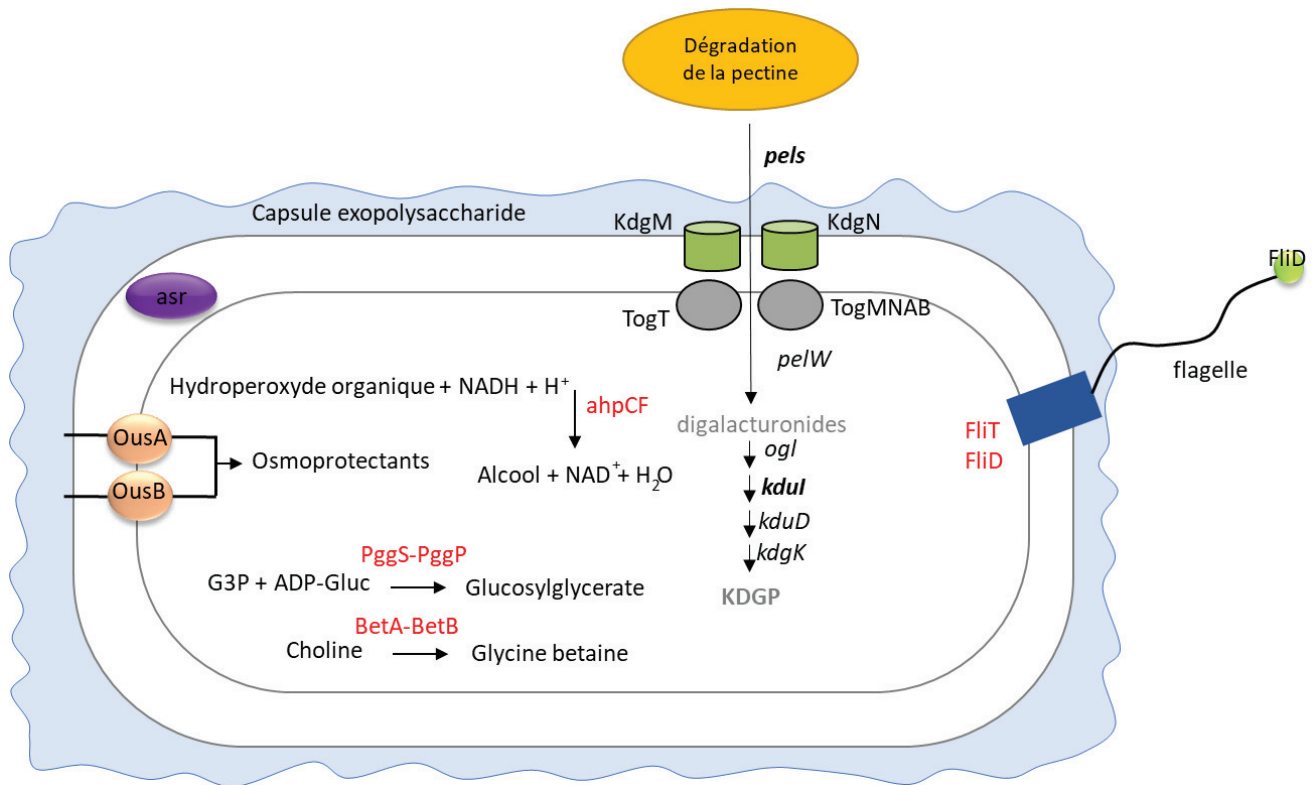


Figure 41 : Les loci ciblés sont impliqués dans l'acclimation ou la virulence. Le schéma représente la localisation des enzymes sélectionnées, les gènes *pels* (A,B,C,D,E,I,L,N et Z) sont impliqués dans la dégradation de la pectine et codent pour des enzymes extracellulaires alors que le gène *kdul* également impliqué dans la dégradation de la pectine code une isomérase cytoplasmique. Les gènes *ousA* et *ousB* codent pour des transporteurs d'osmoprotectants. Le gène *pggS* code pour une glycosyltransférase cytoplasmique est impliqué dans la biosynthèse d'un osmolyte : le glycosylglycerate en réponse à un stress osmotique. Le gène *asr* code pour une chaperone périplasmique qui piège les protons et évite la dénaturation des protéines périplasmique lors d'un stress acide. Les gènes *ahpCF* codent pour une alkylhydroperoxyde réductase cytoplasmique. En réponse à un stress oxydant, elle réduit les hydroxyperoxyde organique en alcool. Le gène *fliT* code pour une chaperonne cytoplasmique qui interagit avec la protéine flagellaire FliD et prévient son agrégation dans le cytoplasme de façon à favoriser son exportation à travers l'anneau d'ancrage du flagelle.



Figure 42 : Expression relative des gènes marqueur aux voisinages des insertions *parS*. Ces graphiques représentent le niveau d'expression des gènes mesuré dans différentes conditions de stress via des puces à ADN. Il s'en suit une augmentation de l'expression de *ousA* en présence de NaCl et une diminution d'expression de *fliT* en présence de NaCl et d'acide malique (A) ; les gènes *pelA* et *pelB* sont faiblement exprimés dans les conditions d'analyse (B), néanmoins on observe une légère augmentation du taux d'expression du gène *pelA* après le choc acide et des diminutions significatives suite aux chocs oxydant et osmotique ; l'expression de *pelB* n'est pas modifiée dans toutes les conditions de stress. Le gène *kdul* est sensiblement activé par le stress oxydant et reste sensiblement constant dans les autres conditions. Le gène *asr* est fortement exprimé en stress acide et réprimé dans les autres conditions. On observe une augmentation de l'expression de l'opéron *ahpCF* en présence d'H₂O₂. Le gène *pggS* est exprimé dans le cas des stress osmotique et oxydant, l'expression du gène est légèrement plus importante dans le cas d'un stress osmotique. Le locus *pggS* n'est pas exprimé dans les conditions standard et en cas de stress acide.

Dans la mesure du possible, deux loci répondant de manière antagoniste aux stress environnementaux ont été marqués au sein d'une même cellule de manière à s'assurer de la cohérence de la réponse. Les associations de marquage ont également été réalisées de manière à apprécier des réponses variables aux différents types de stress ou pour permettre de suivre des processus particuliers. Les constructions sont décrites ci-dessous pour illustrer la stratégie retenue pour les doubles marquages des souches (figure 43). Afin de comprendre

la stratégie trois exemples sont décrits en détails. Le premier couple comprend les régions *oriC* et *ter* utilisées comme contrôle. Le deuxième exemple concerne les loci *ousA* et *fliT*. Ces deux régions ont des profils d'expression opposés en conditions de stress osmotique, *fliT* est localisé dans le domaine d7 réprimé en stress osmotique alors que *ousA* est localisé dans le domaine d4 et est activé en stress osmotique. Enfin, le troisième couple concerne les gènes *peIA* et *peIB* distants de 863 kb et codant des pectate lyases qui dégradent les parois des cellules végétales lors de l'infection. Comme indiqué dans la partie bibliographique, ces deux gènes sont régulés par un facteur de transcription commun : KdgR, le régulateur principal des gènes impliqués dans la dégradation des composés pectiques. Des prédictions bio-informatiques avaient suggérées que les sites de fixation du régulateur KdgR, dispersés sur le chromosome de *D. dadantii*, se rapprochent spatialement lors du repliement tridimensionnel du chromosome pour permettre une synchronisation de leur expression (Bouyioukos et al., 2016); le double marquage *peIA ::parSpMT1* et *peIB ::parSp1* avait pour objectif de vérifier des éventuelles co-localisation de ces gènes.

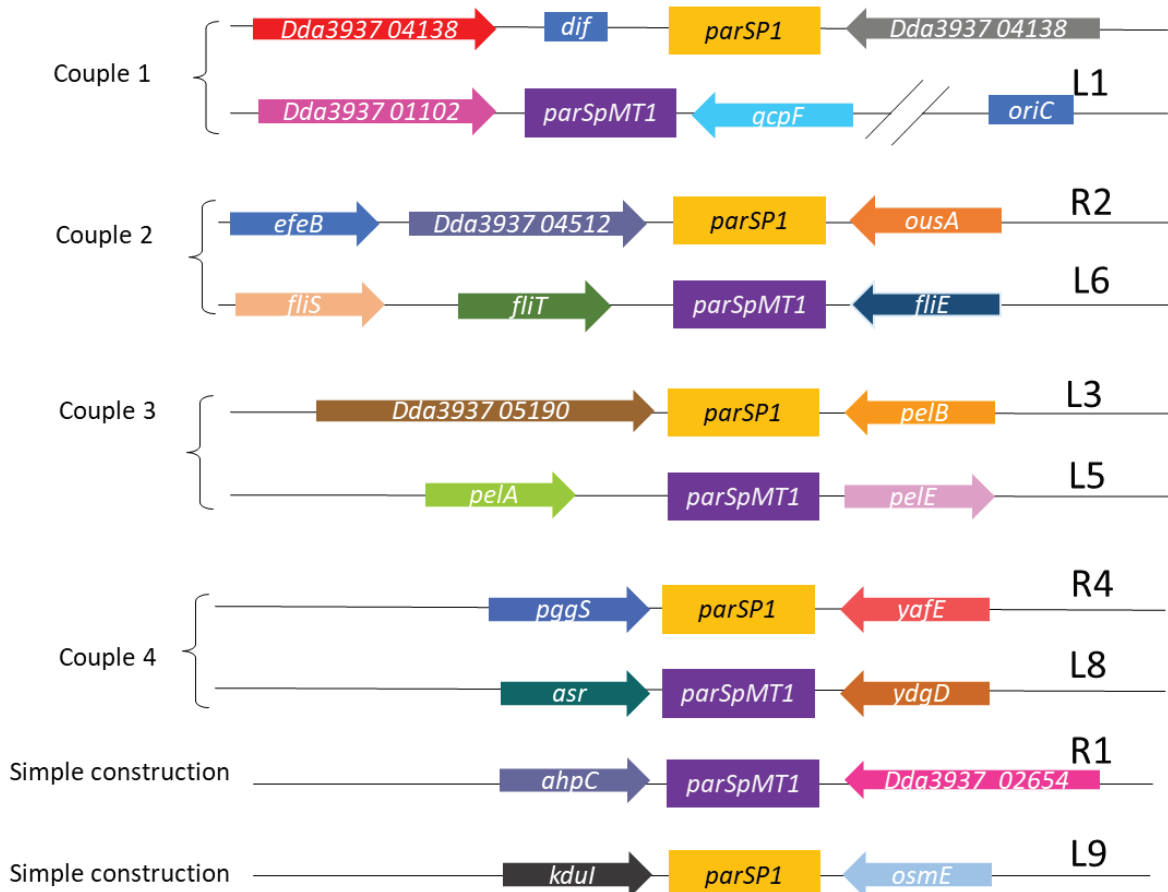


Figure 43 : Représentation des constructions génétiques avec insertion *parS*. Les étiquettes *parS* ont été insérées dans des régions intergéniques à proximité des loci d'intérêt. Les gènes sont marqués avec des *parS* différents afin de pouvoir coupler les insertions et ainsi d'observer le marquage de deux loci en même temps dans une cellule. Les loci voisins des gènes d'intérêt sont présentés. La région du réplicore R (right = droit) et L (left = gauche) où les insertions ont été effectués est rappelée sur la figure.

2) Le système *parS*-ParB ne modifie pas significativement la croissance de *D. dadantii* ainsi que l'expression des gènes voisins des loci sélectionnés

Avant toute étude de la dynamique des loci, des contrôles ont été réalisés de manière à apprécier dans un premier temps, l'impact du système de visualisation retenu sur la croissance des souches comportant les insertions *parS* selon le protocole expérimental de la figure 44.

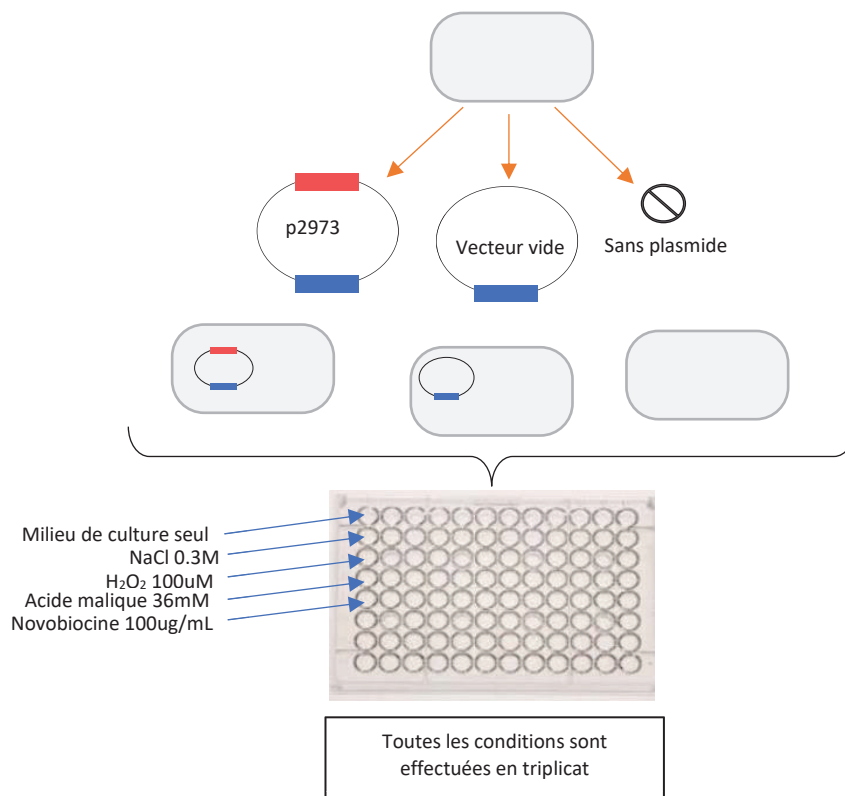


Figure 44 : Protocole expérimental permettant l'étude de l'impact du système *parS*/ParB sur la croissance bactérienne. Les cellules sont cultivées dans différentes conditions : sans plasmide, en présence du vecteur codant les protéines ParB, en présence du vecteur délété de la séquence ParB par digestion enzymatique (vecteur vide) comme contrôle. Après une pré-culture en milieu minimum M63 (voir matériel et méthode) pendant 24h les cultures sont diluées puis de l'IPTG a été ajouté à une concentration finale de 1 mM pour induire la production de ParB et les cultures ont été incubées en plaque 96 puits avec inducteur de stress. Les croissances bactériennes sont suivies par mesure de D.O à 600nm en lecteur de plaque Técan Spark avec une mesure de D.O à une intervalle de 5min pendant 10h.

Ainsi, des suivis de croissance ont été réalisés par mesure en cinétique de la densité optique à 600 nm grâce au « Técan Spark » pour la souche sauvage de *Dickeya dadantii* (figure 45) ainsi que pour des dérivés possédant des insertions *parS*, tels que l'origine et le terminus de réplication (figure 46) ou les gènes *ousA* et *fliT*, contenant ou non le plasmide portant ParB (figure 47).

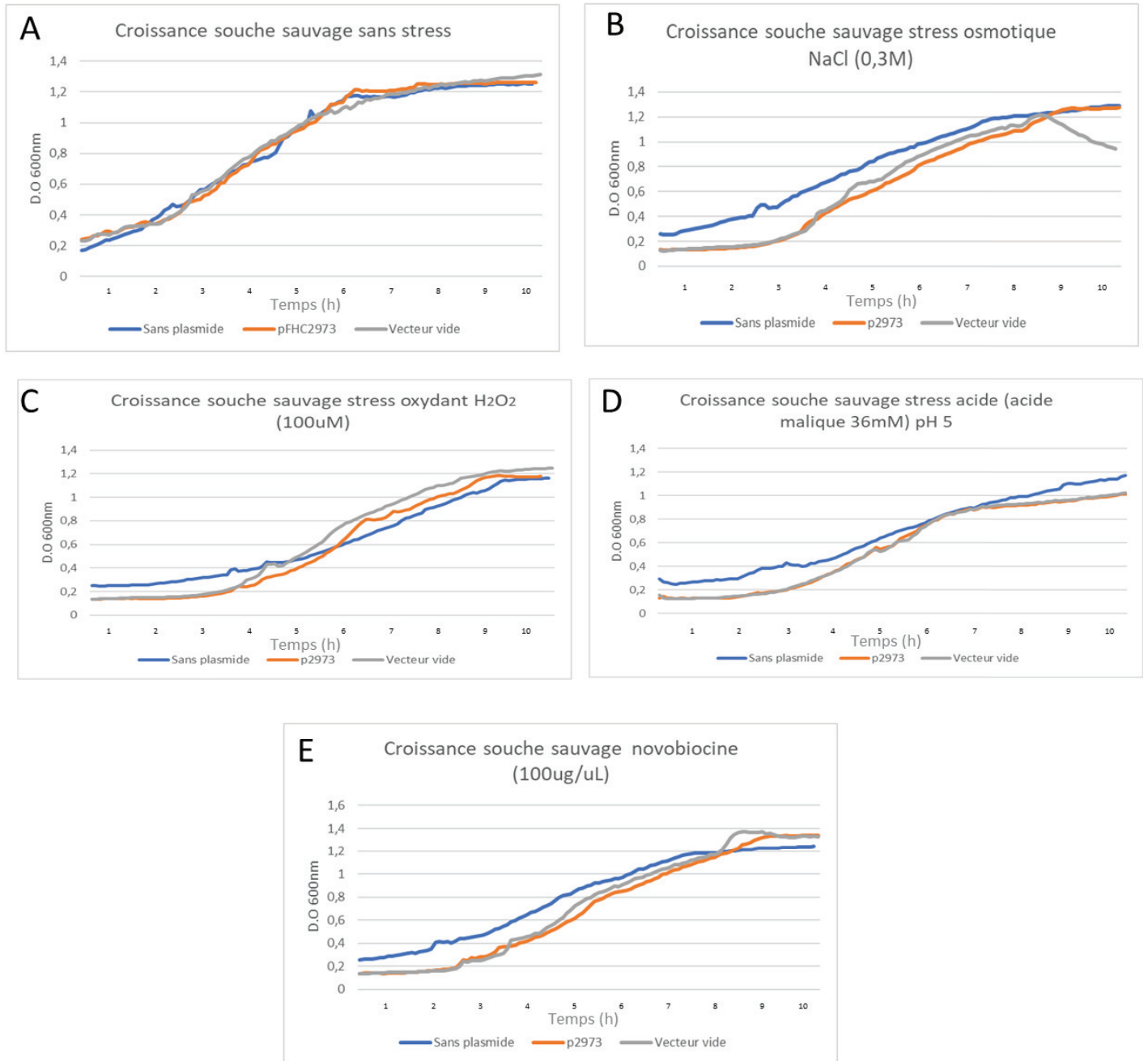


Figure 45 : Mesure de la croissance de la souche de *Dickeya dadantii* sauvage par mesure de la D.O à 600nm au « Técan Spark ». Les cellules ont été transformées avec le plasmide p2973 codant les protéines ParB (ParBP1 et ParBMT1) et avec le plasmide délété par digestion enzymatique de la séquence codant pour la protéine ParB (vecteur vide). La croissance des cellules a été mesurée dans la condition standard (A) et dans les diverses conditions de stress : stress osmotique induit par la présence de NaCl à 0,3M (B), stress oxydant en présence d'H₂O₂ à 100uM (C), stress acide obtenu par la présence d'acide malique à 36mM (correspondant à un pH 5) (D), et stress à la novobiocine qui permet de diminuer les supertours négatifs de l'ADN en ajustant la concentration finale de la culture à 100ug/mL (E). Les mesures de D.O ont été réalisées à 600nm à un intervalle de 5min pendant 10h.

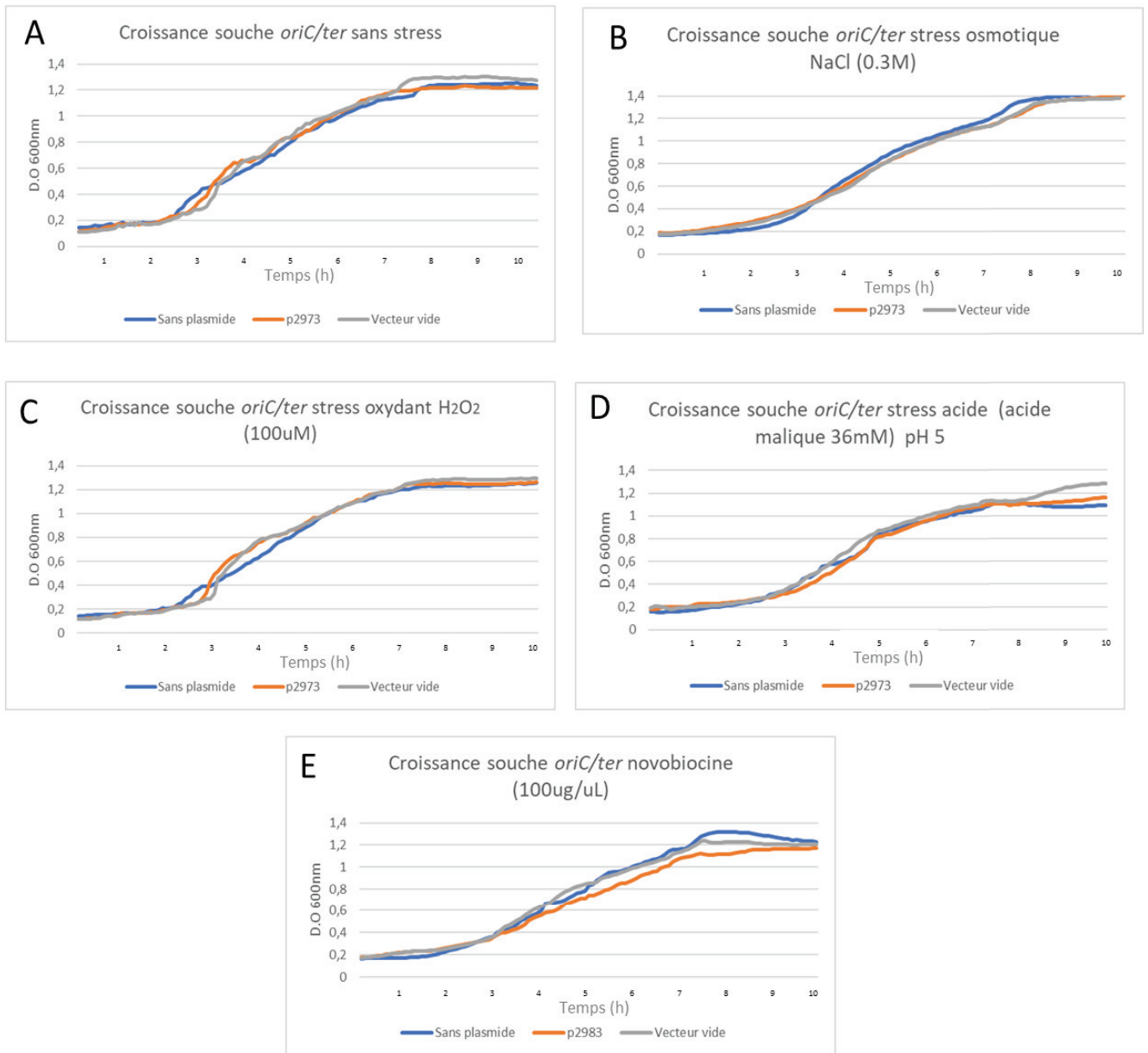


Figure 46 : Mesure de la croissance de la souche de *Dickeya dadantii* possédant des insertions *parS* au voisinage de l'origine (*oriC*) et du terminus de réplication (*ter*) par mesure de la D.O à 600nm au « Técan Spark ». Les cellules ont été transformées avec le plasmide p2973 codant les protéines ParB (ParBP1 et ParBMT1) et avec le plasmide délété par digestion enzymatique de la séquence codant pour la protéine ParB (vecteur vide). La croissance des cellules fut mesurée dans la condition standard (A) et dans les diverses conditions de stress : stress osmotique médier par la présence de NaCl à 0,3M (B), stress oxydant en présence d'H₂O₂ à 100uM (C), stress acide par la présence d'acide malique à 36mM correspondant à un pH 5 (D) et stress à la novobiocine qui permet de diminuer les supertours négatifs de l'ADN en ajustant la concentration finale de la culture à 100ug/mL (E). Les mesures de D.O ont été réalisés à 600nm avec un intervalle de 5min pendant 10h.

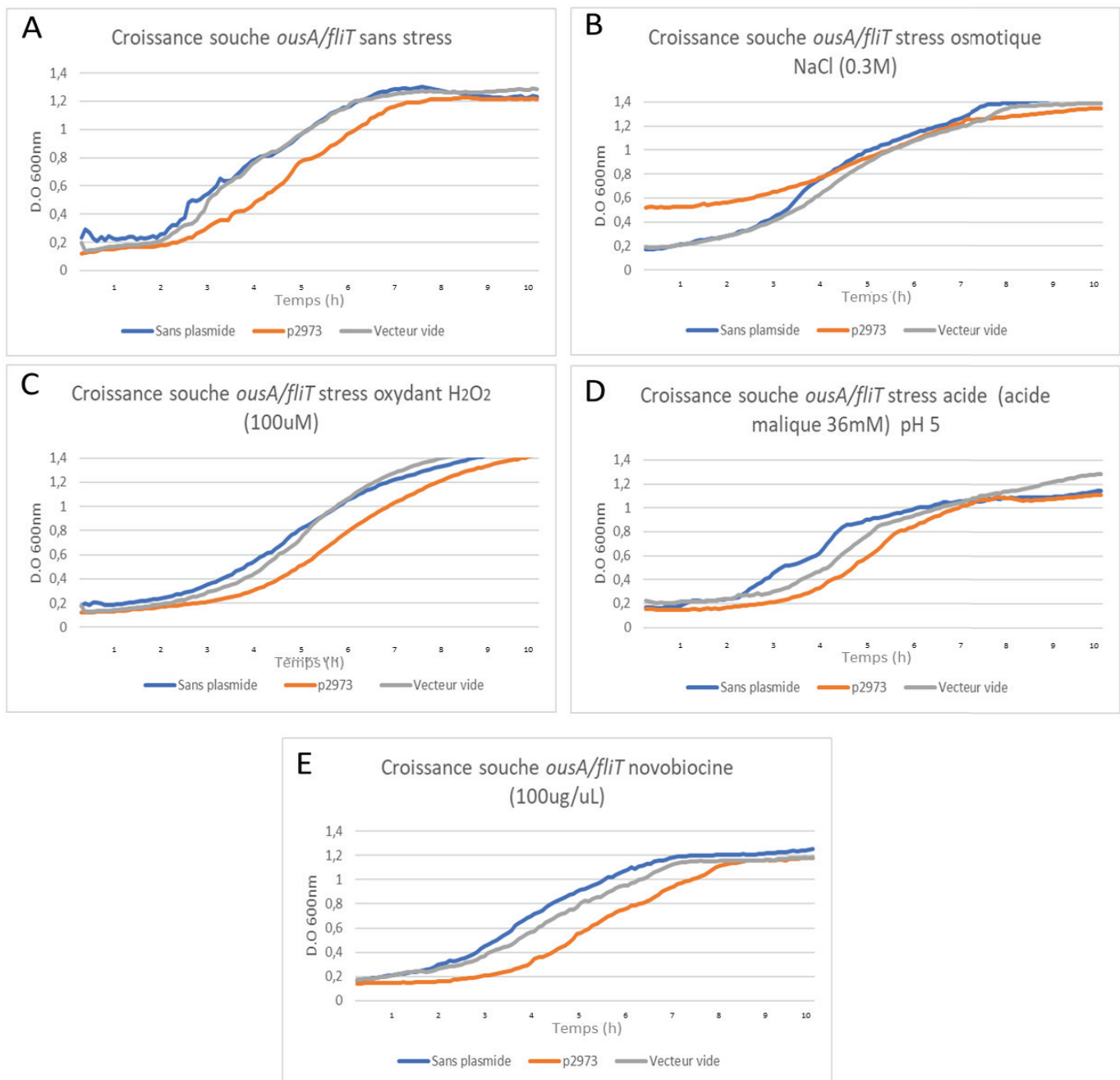
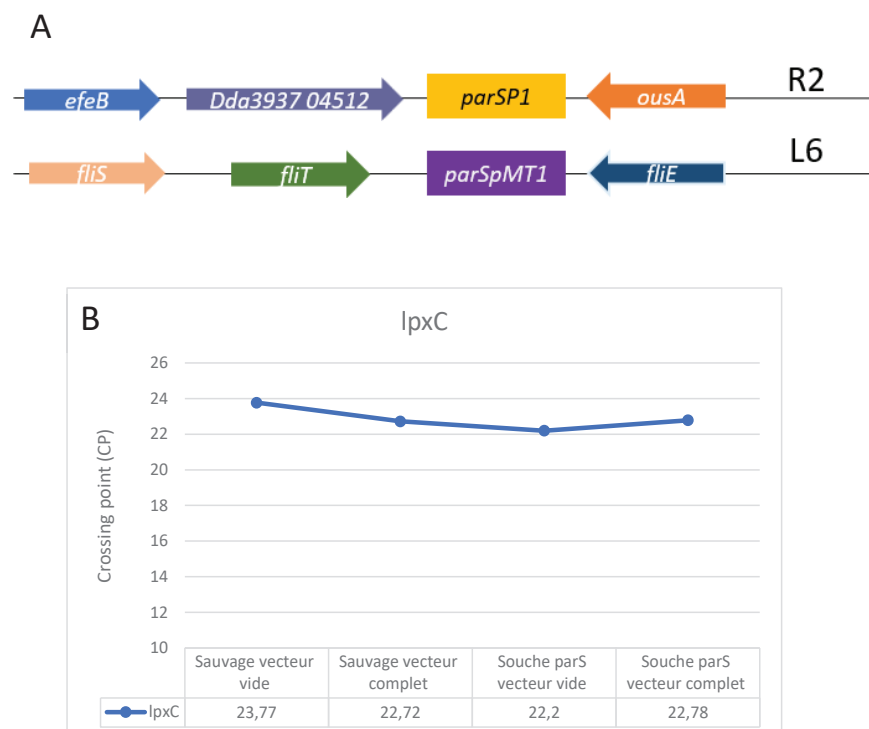


Figure 47 : Mesure de la croissance de la souche de *Dickeya dadantii* possédant des insertions *parS* au voisinage du gène *ousA* et du gène *fliT* par mesure de D.O à 600nm au « Tècan spark ». Les cellules ont été transformées avec le plasmide p2973 codant les protéines ParB (ParBP1 et ParBMT1) et avec le plasmide délété par digestion enzymatique de la séquence codant pour la protéine ParB (vecteur vide). La croissance des cellules a été mesurée dans la condition standard (A) et dans les diverses conditions de stress : stress osmotique par ajout de NaCl à 0,3M (B), stress oxydant en présence d'H₂O₂ à 100uM (C), stress acide par ajout d'acide malique à 36mM, correspondant à un pH 5 (D) et stress à la novobiocine qui permet de diminuer les supertours négatifs de l'ADN en ajustant la concentration finale de la culture à 100ug/mL (E). Les mesures de D.O à 600nm ont été réalisées toutes les 5 min pendant 10h.

Ces expériences ont permis de confirmer que les conditions de stress (osmotique, oxydant, acide et novobiocine) utilisées n'ont pas un impact significatif sur la croissance de la souche parentale et des souches dérivées contenant des insertions *parS*.

Dans un second temps l'effet du système *parS*/ParB sur l'expression des gènes voisins des sites d'insertion de la séquence *parS* a été évaluée. En effet il a été précédemment rapporté que la fixation de la protéine ParB entraînait une modification significative de la topologie des régions voisines du site d'insertion de *parS* (Bouet et al., 2000). Cette évaluation a été réalisée en quantifiant, via la qPCR, l'expression des gènes *ousA* et *efeB* qui partage une région intergénique, contenant une insertion *parSP1*, ainsi que sur le gène *fliS* qui comporte dans son voisinage une insertion *parSpMT1* (figure 48 A). L'expression relative de ces gènes, dans les conditions testées, s'est avérée d'un niveau similaire dans la souche sauvage et dans les souches dérivées possédant les insertions *parS* sont comparables dans les conditions de production ou non des protéines ParB. Ainsi, Il semblerait donc que le système *parS*/ParB n'a pas d'impact significatif sur l'expression des gènes voisins dans nos conditions expérimentales (figure 48 C).



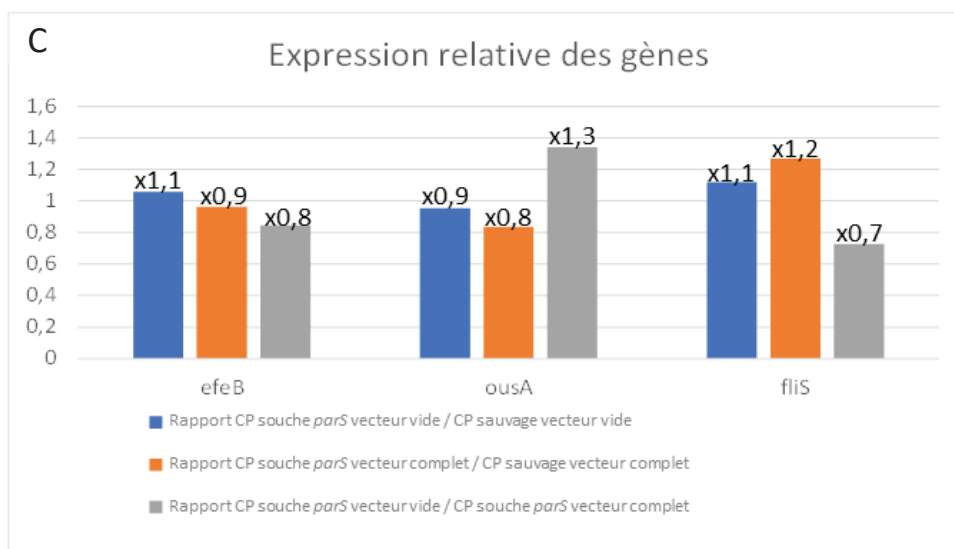


Figure 48 : Quantification de l'expression relative des gènes possédant des insertions *parS* dans leur région intergénique par qPCR. Pour rappel l'insertion des séquences *parS* est effectuée dans le région intergénique entre deux gènes *ousA/fliT* (A). Les cellules ont été transformées avec le plasmide p2973 codant les protéines ParB (ParBP1 et ParBMT1) et avec le plasmide sans insert (vecteur vide). Les cultures ont été réalisées en milieu minimum M63 supplémenté en saccharose 0,2%, après environ 2 heures de cultures (D.O 600 nm de 0.2) puis de l'IPTG a été ajouté à une concentration finale de 1 mM pour induire la production de ParB (voir Matériels et Méthodes) durant 2 heures de culture supplémentaire. Les ARN ont par la suite été extraits des différentes cultures puis convertis-en cDNA pour être quantifiés via des réactions de qPCR. La comparaison des seuils de détection de fluorescence des ADNc avec ceux de la gamme étalon permet de calculer leur concentration. Ces expressions ont ensuite été normalisées en se référant à l'expression du gène de référence *lpxC*. Les points de croisements (CP) du gène *lpxC* ont été mesuré par RT-qPCR et sont stable dans les différentes conditions (B). Les Cps correspondent au cycle auquel la fluorescence émise par le Sybr Green devient détectable. Le niveau d'ARNm relatif d'un gène pour un échantillon est calculé comme suit : Niveaux relatifs d'ARNm = $2^{-(Cp(\text{gène})-Cp(\text{gène de référence}))}$. Les rapports de CP (cycle de seuil de détection) obtenus pour les différentes combinaisons sont présentés : ils sont tous proches de 1 et permettent donc de conclure que l'insertion des séquences *parS* ainsi que la production de ParB ne modifie pas l'accumulation des transcrits des gènes *ousA*, *efeB* et *flis* et donc l'expression des gènes.

3) Tentative de construction d'un système plasmidique portant les protéines ParB relativement stable chez *D. dadantii*

Au cours de l'observation microscopique des loci au microscope à fluorescence à haute résolution des variabilités de marquage des cellules ont été observées. En effet dans une seule et même population les cellules présentaient des niveaux de fluorescence différent biaisant dans certains cas l'analyse de localisation des loci.

Afin d'identifier la source de ces hétérogénéités de marquages entre les populations bactériennes, des expérimentations ont été mises en place (figure 49). Ceci de manière à voir

si la source des variations était due à une hétérogénéité de population, c'est-à-dire des clones issus de cultures différentes avaient des comportements variables, ou étaient plutôt le résultat d'une hétérogénéité développementale, c'est-à-dire un clone présentera une fluorescence différente en fonction de son état physiologique.

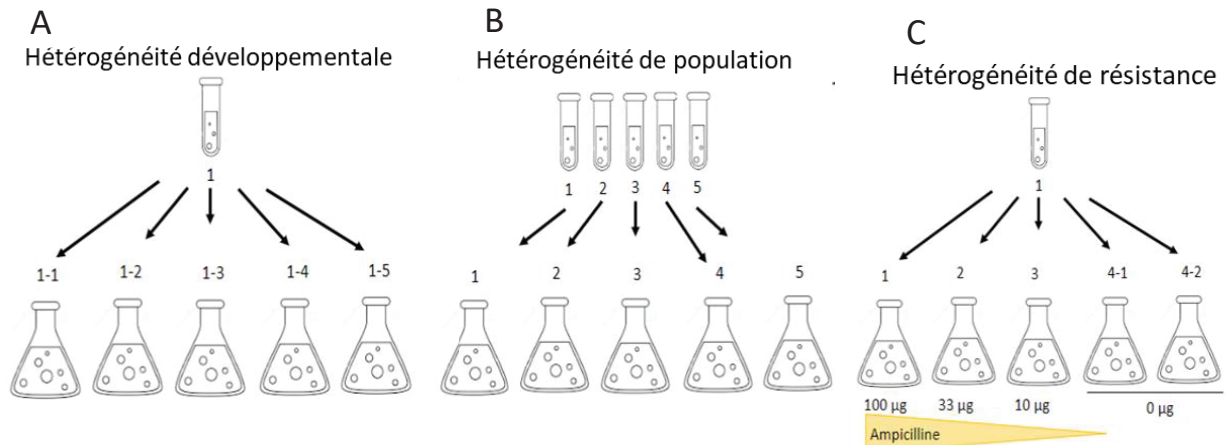
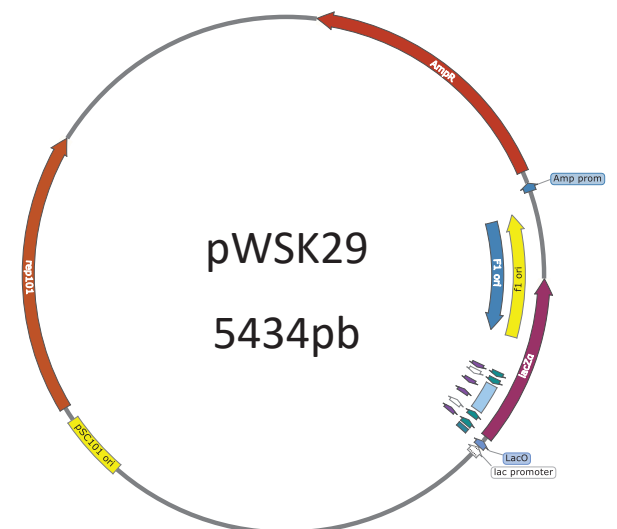
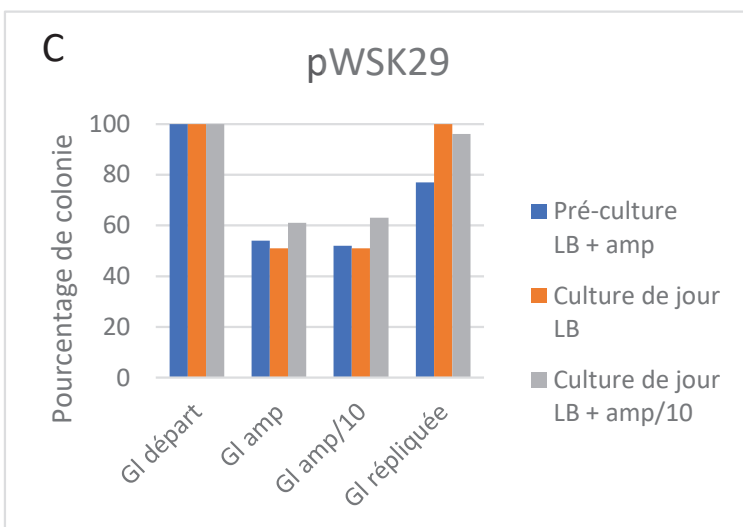
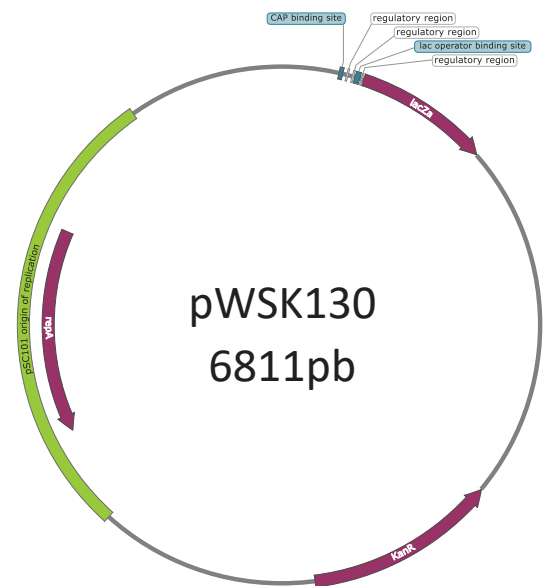
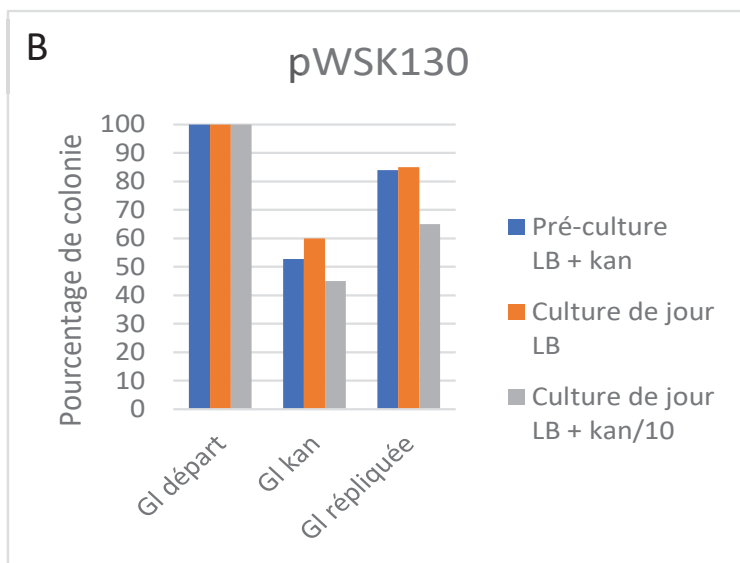
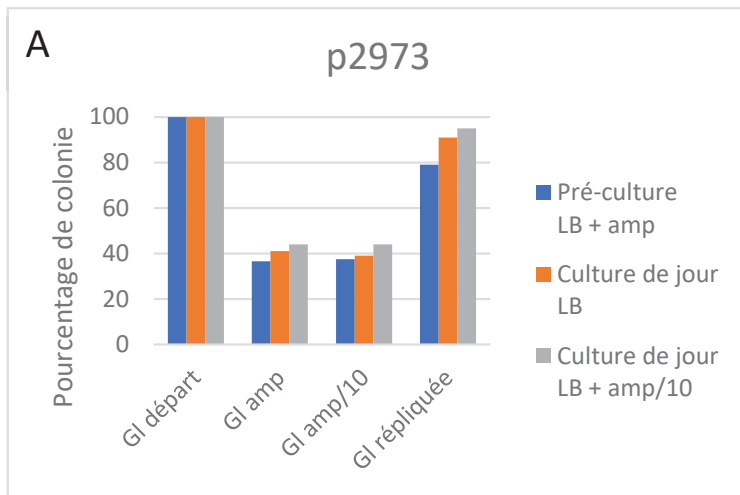


Figure 49 : Schéma représentant le plan expérimental permettant l'étude de la variation plasmidique chez *D. dadantii*. La variabilité intra-clone est testée dans un premier temps en incubant en parallèle différents clones issus d'une même transformation bactérienne (A). La variabilité inter-clone est aussi étudiée en incubant en parallèle un seul et même clone dans plusieurs cultures (B). Et enfin l'impact de la présence d'ampicilline, dont le gène de résistance est porté par le plasmide p2973 codant les protéines ParB, sur la stabilité du plasmide et du marquage est vérifié en plaçant un clone dans différentes cultures avec des concentrations décroissantes d'antibiotique (C).

En effectuant les différents plans expérimentaux, nous avons pu conclure que dans une population de différents clones le pourcentage de cellules présentant des spots de fluorescence est stable entre les clones. De même lorsque nous étudions la variabilité intra-clone, on observe qu'un clone unique présente un pourcentage de cellules marquées constant entre différentes cultures. Dans un dernier temps afin d'augmenter le nombre de cellules présentant des spots de fluorescence, la pression de sélection a été maintenue au cours de la culture. Cependant, il a été observé que lorsque la pression de sélection est maintenue à concentration relativement forte (ampicilline 100 µg/ml), les cellules obtenues ne permettaient pas une analyse pertinente au microscope ; les cellules présentaient dans ces conditions des structures caractéristiques de stress : une forme allongée avec dans certains cas la formation d'agrégats ou de filaments. Aucune amélioration n'a été observée en utilisant une concentration dix fois plus faible d'ampicilline (concentration à 10 µg/ml). Nous avons

donc conclu que l'hétérogénéité des signaux fluorescents observé dans nos populations était dû à une perte massive du plasmide portant les gènes *parB* couplés à ceux de marqueurs fluorescents. Pour rappel, les protéines fluorescentes permettant la visualisation des spots sont portées par le plasmide p2973 qui est un dérivé du plasmide pUC ayant un nombre de copie par cellule relativement élevé d'environ 50 à 100. Nous avons donc décidé de transférer le système de visualisation, ParB -marqueur de fluorescence dans un plasmide de faible nombre de copie couramment utilisée pour des expériences de complémentation en trans chez *D. dadantii*.

Nous avons testé la stabilité de deux plasmides : les plasmides de type pWSK inductible à l'IPTG comme le p2973 (pWSK29 résistant à l'ampicilline et le pWSK130 résistant à la kanamycine) et le pBBRpBAD inductible à l'arabinose et résistant à l'ampicilline. Dans un premier temps les bactéries ont été transformées avec les différents vecteurs, puis mises en culture dans les conditions de l'observation microscopique et étalées sur milieu contenant ou non les antibiotiques de sélection appropriés. Des comptages ont été réalisés sur les transformants dans les différentes conditions afin de déterminer le pourcentage de bactérie ayant conservées le plasmide après mise en culture (figure 50).



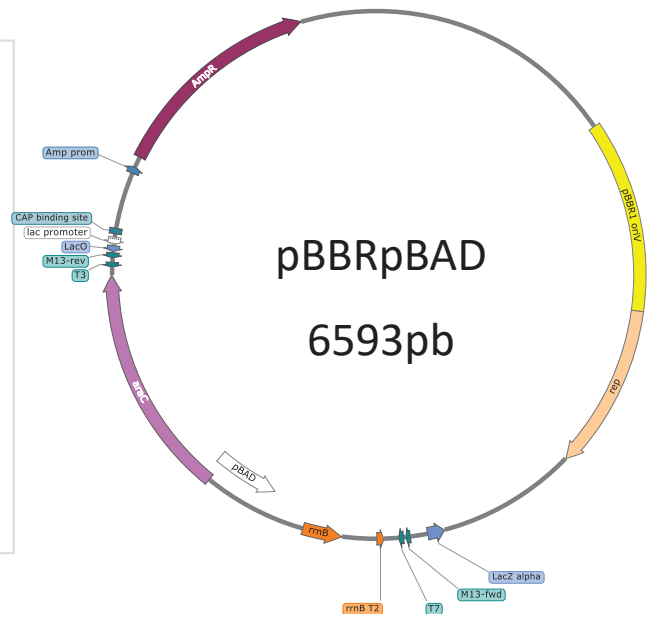
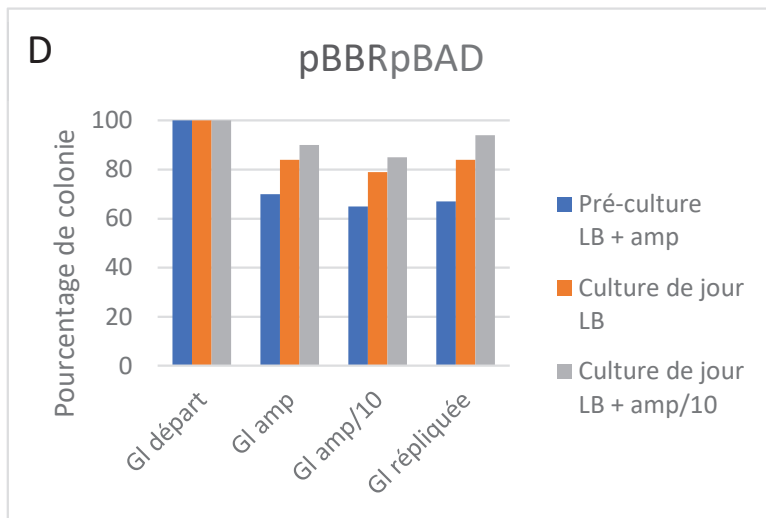


Figure 50 : Stabilité des plasmides chez *Dickeya dadantii*. Les cultures ont été effectuées en milieu riche LB Luria Bertani puis étalées sur différents milieux de sélection à base de GL (voir matériel et méthode). Le plasmide p2973 possédant un gène de résistance à l'ampicilline présente un taux de perte de 60% (A). Le plasmide pWSK130 possédant un gène de résistance à la kanamycine présente un taux de perte de 65% (B). Le plasmide pWSK29 possédant un gène de résistance à l'ampicilline présente un taux de perte de 55% (C). Et le plasmide pBBRpBAD possédant un gène de résistance à l'ampicilline présente un taux de perte 35% (D). La construction ParB a donc été transféré du p2973 au pBBRpBAD par clonage. Les cartes des plasmides sont obtenues via le logiciel SnapGene et sont présentées avec les histogrammes.

Compte tenu des résultats de la figure ci-dessus, le plasmide pBBRpBAD a été retenu pour la construction. Les résultats obtenus avec le plasmide recombinant pBBRpBAD_ParB1::mCherry/parBMT1::GFP se sont toutefois avérés peu reproductible certainement en raison du fait que l'inducteur, l'arabinose, est un métabolite dont la concentration cellulaire doit varier en fonction de l'état physiologique des cellules. Par ailleurs, l'intensité du signal émis par ce plasmide s'est avérée relativement faible en raison de son nombre de copie limité. La suite des investigations a été réalisée avec le plasmide p2973 malgré les problèmes évoqués ci-dessus.

4) Tentatives d'amélioration de la stabilité du plasmide p2973

Durant mon stage de M2 et la grande majorité de ma première année de thèse, j'ai pu réaliser des études convenables avec le plasmide p2973 sur des cultures de *D. dadantii* réalisées en M63 supplémenté avec du saccharose, milieu couramment utilisé pour les études sur *Dickeya*. Ainsi, des résultats cohérents et novateurs ont été obtenus sur la souche parentale pour l'étude de la co-localisation spatiale des gènes *pels* ainsi que les stress osmotiques et oxydant (voir ci-dessous). Par la suite, mon équipe d'accueil a déménagé du bâtiment Lwoff pour le bâtiment Pasteur de l'INSA de Lyon. Après cela, les problèmes de croissance et d'hétérogénéité de fluorescence ont été observés. A la fin de la deuxième année et en accord avec notre collaborateur C. Lesterlin, différents essais de cultures susceptibles d'améliorer la stabilité du plasmide p2973 ont été testés. Nous avons dans un premier temps remplacé le milieu M63 par le milieu riche RDM EZ Rich Medium (Takara), couramment utilisé par l'équipe de C. Lesterlin pour l'analyse de différents processus, dont le cycle cellulaire et la résistance aux antibiotiques, chez *E. coli* via la microscopie. Cependant après diverses expériences nous nous sommes rendu compte que l'impact des différents stress dans ce milieu riche était atténué par rapport à celui précédemment observé en milieu minimum M63. Ce résultat pourrait être lié à la force osmotique relativement importante du milieu RDM qui contient environ 50 mM de NaCl. En effet, il est connu que les mécanismes mis en place par les bactéries face à des stress modérés leurs permettent de s'acclimater à des stress ultérieurs plus prononcés (Follmann et al., 2009; Hayes et al., 2006). Ainsi, il s'est avéré que le milieu RDM n'était pas approprié pour nos études. Il a donc été décidé de revenir au milieu minimum

M63 pour effectuer nos manipulations de stress cellulaire. Divers ajustements et essais de cultures ont été réalisés dans ce milieu afin d'améliorer la proportion de cellules émettant de la fluorescence lors des observations au microscope. Ils ont concerné l'antibiotique (concentration et nature), la DO d'induction de la synthèse des protéines ParB, la présence d'antibiotique dans les cultures d'expression, la durée de la pré culture notamment ; les résultats obtenus sont résumés dans le tableau 7 ci-dessous.

Paramètres	Variations	Impact physiologique	Impact sur la fluorescence
Milieu de culture	RDM	Pas d'effets des stress	Marquages faible
	M63	Conditions optimales	Marquages optimaux
Antibiotique	Ampicilline	Perte importante du plasmide	Perte du marquage
	Carbenicilline	Maintien du plasmide	Gain de marquage
Induction	D.O 0,2	Pas d'impact	Temps d'induction long
	Dès le début de la culture	Phase de latence plus importante	Marquages optimaux
D.O d'observation	D.O 0,3	Phase précoce de croissance	Marquages optimaux
	D.O 0,6	Phase de croissance exponentielle	Peu de marquages
	D.O 0,8	Début de phase stationnaire	Peu de marquages
Temps d'agitation	1h	Agrégation importante	Peu de marquages
	3h	Meilleure physiologie	Peu de marquages
	5h	Meilleur physiologie	Marquages optimaux
Clone en pré-culture	Polyclonal	Bonne physiologie	Marquages hétérogène
	Monoclonal	Bonne physiologie	Marquages homogène
Plasmide	pBBRpBAD ::parB	Perte relative	Peu de marquage
	P2973 ::parB	Perte importante	Marquages moyen
Durée pré-culture	24h	Peu de croissance et filamentation	Peu de marquages
	36h	Croissance optimale	Marquages optimaux
pH du milieu	7	Filamentation	Peu de marquages
	7,2	Croissance optimale	Marquages optimaux
Contenant	Tube	Phase de latence plus importante	Peu de marquages
	Erlen	Croissance optimale	Marquages optimaux
Métaux	Sans ajout	Phase de latence importance	Marquages optimaux
	+Mg, Fe, Co	Pas d'impact	Pas d'impact
Age transformation	48h	Croissance optimale	Marquages optimaux
	72h	Phase de latence plus importante	Peu de marquages

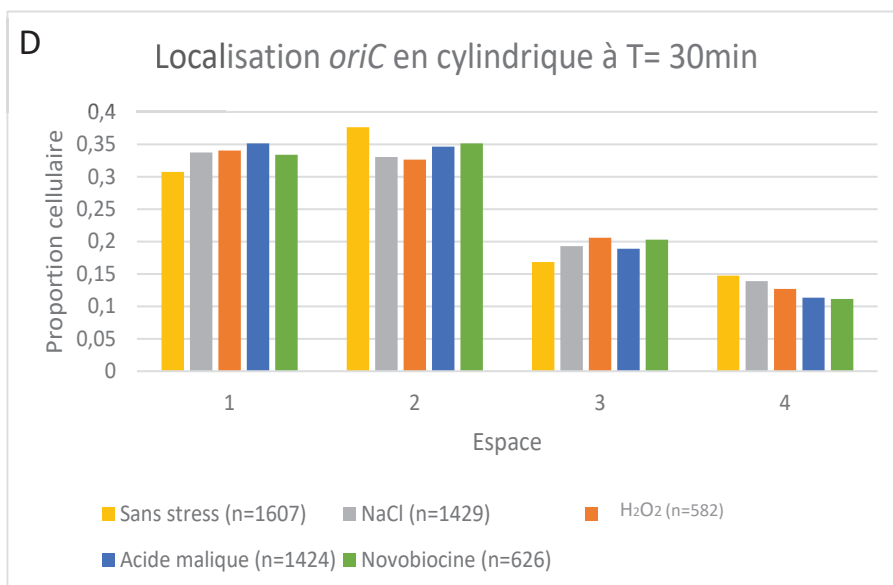
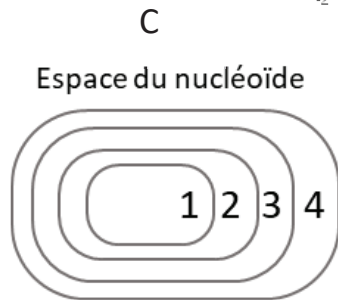
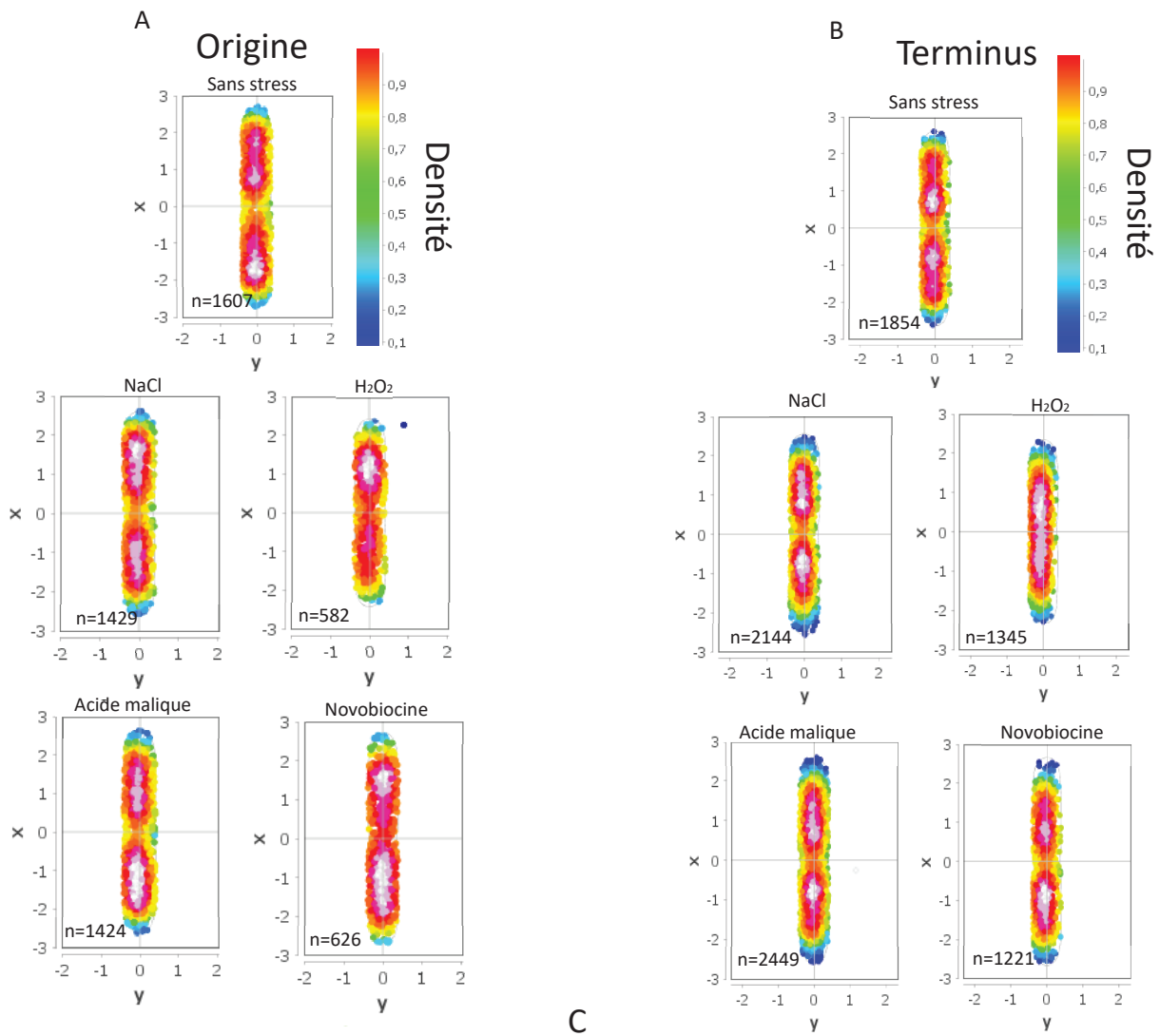
Tableau 7 : Récapitulatif des conditions de cultures testées. Les conditions retenues comme étant optimales sont notées rouge.

Ces différents essais nous ont permis de définir les conditions suivantes en milieu M63 pour un marquage et une physiologie optimale : utilisation de la carbenicilline, un analogue plus stable de l'ampicilline, induction de l'expression du plasmide via l'IPTG dès le début de la culture, observation des cellules à une D.O maximum de 0,3, agitation de la culture pendant 5h minimum avant observation et effectuer les cultures dans des contenant type Erlenmeyer

pour augmenter l'aération. Les pré-cultures doivent être lancés en monoclonal et pendant 36h.

5) L'origine et le terminus de réplication restent stables dans nos conditions d'étude

Afin de s'assurer de la stabilité des loci *oriC* et *ter*, une souche contenant des marquages proche de ces deux positions (souche D0061 *ter::parSP1-Rif^R* , *oriC::parSpMT1-Cm^R*) a été cultivée dans les différentes conditions expérimentales, les cellules ainsi obtenues ont été analysées au microscope comme précédent décrit. Les résultats de la figure 51 indiquent une relative stabilité de localisation subcellulaire pour ces deux loci quel que soit la condition considérée. Les loci *oriC* et *ter* constituent donc, en plus de *pelB*, de bons contrôles pour l'étude de l'impact des stress environnementaux sur la localisation subcellulaire des loci d'intérêt.



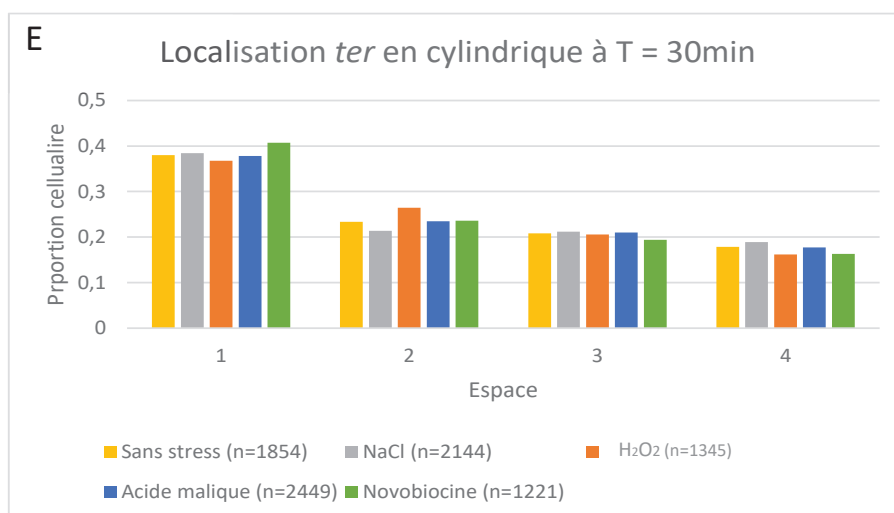


Figure 51 : Localisation des loci *oriC* et *ter* dans les différentes conditions. Ces graphiques représentent la carte de densité des spots de fluorescence au sein des cellules. Les couleurs blanche et rouge indiquent qu'un grand nombre de cellules présente un spot localisé à cette position subcellulaire et la couleur bleue que seul un faible nombre de cellules possèdent un spot à cet endroit. En condition standard, les loci *oriC* (A) et *ter* (B) sont étalés le long de la cellule. Lors de l'induction des stress osmotique par ajout de NaCl 300mM, oxydant par ajout d'H₂O₂ 100uM, acide par ajout d'acide malique 36mM pour descendre à un pH 5 et novobiocine 100ug/mL, les localisations des loci ne sont pas modifiées de façon significative. Ces localisations sont représentées dans les graphiques de localisation des spots en cylindrique dans la cellule. Dans cette représentation le nucléoïde est découpé en 4 tranches de volume égal du cœur vers la périphérie comme montré sur le schéma (C), on observe que la répartition des spots de fluorescence de *oriC* (D) et *ter* (E) n'est pas significativement modifiée dans les différentes conditions.

6) Le volume du nucléoïde de *D.dadantii* demeure stable dans les différentes conditions d'études

Avant d'entreprendre les investigations prévues, nous avons voulu nous assurer que les différentes conditions d'étude ne modifiaient pas la structure globale du nucléoïde. Nous avons dans un premier temps, utilisé la coloration au 4',6-diamino-2-phenylindole (Dapi), une molécule fluorescente capable de se lier fortement aux bases adénine (A) et thymine (T) de l'ADN. Elle permet par conséquent de visualiser le nucléoïde et éventuellement de quantifier l'ADN cellulaire via un microscope à fluorescence ou un cytomètre. Cette coloration a révélé que dans des cellules de *D. dadantii* en phase de croissance exponentielle le nucléoïde présente globalement une structuration similaire dans les conditions de croissance standard et après application de stress acide, osmotique et oxydant (figure 52 et 53).

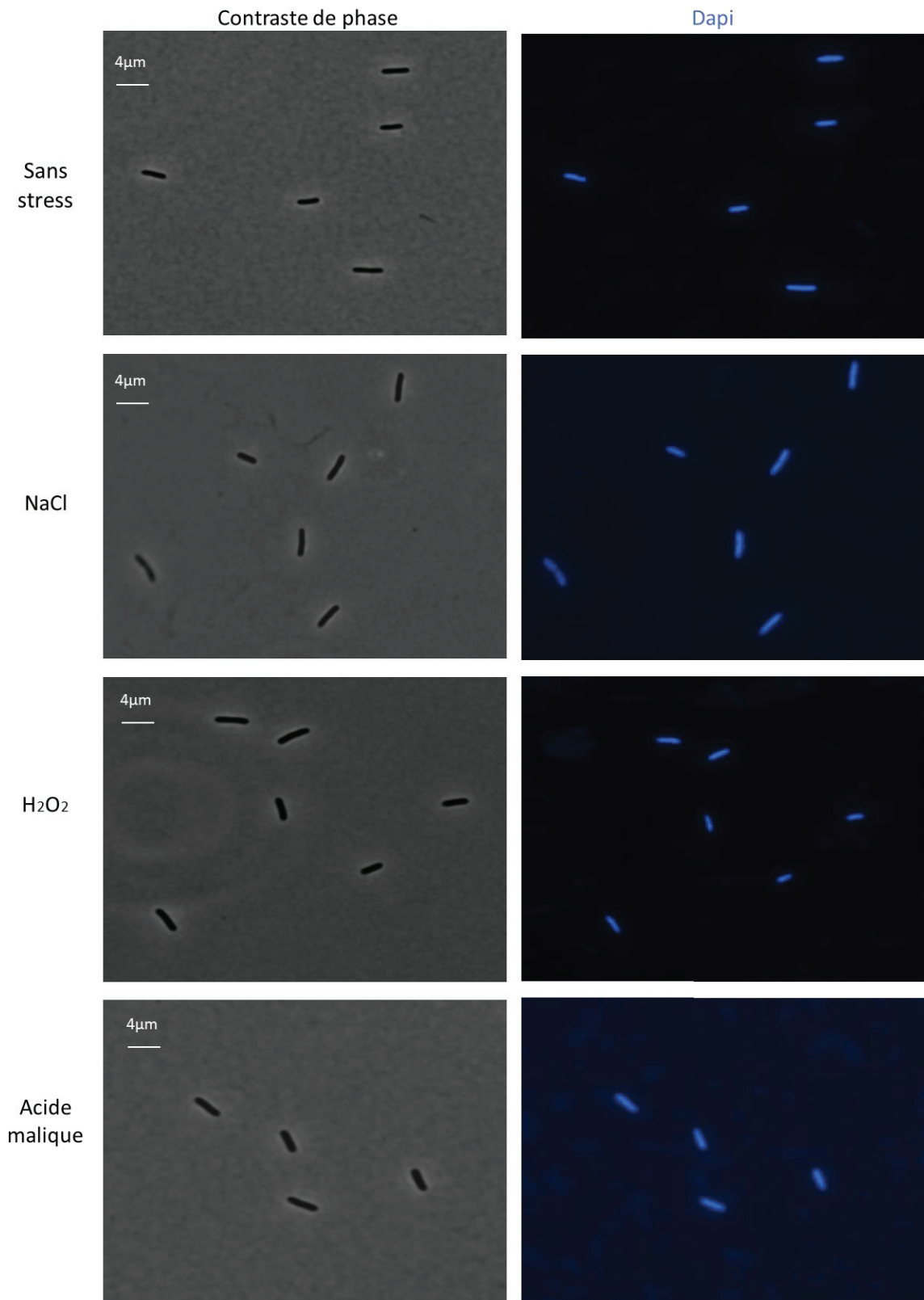


Figure 52 : Aspect du chromosome en fonction des conditions de stress. Le nucléoïde est observé grâce à un marquage au Dapi. Les différentes conditions de stress sont réalisées par l'induction des stress osmotique par ajout d'NaCl 300mM, oxydant par ajout d'H₂O₂ 100uM, acide par ajout d'acide malique 36mM pour obtenir un pH 5. L'aspect du nucléoïde n'est pas modifié par les différentes conditions.

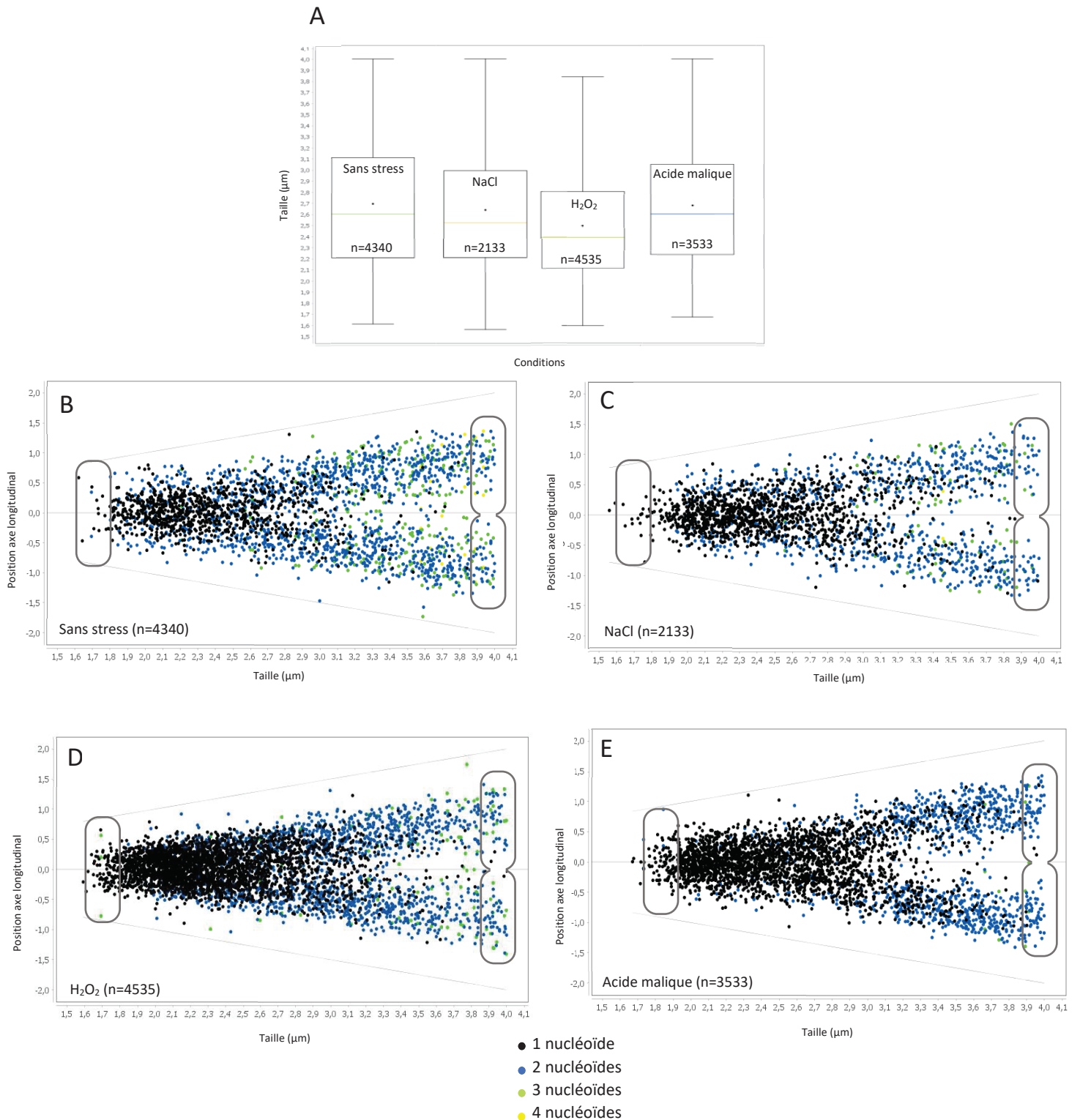


Figure 53 : Physiologie de *Dickeya dadantii* dans les différentes conditions. Les boîtes à moustaches représentent la taille moyenne des cellules dans les différentes conditions (A), on observe une diminution légère de la taille des cellules dans le cas d'un stress oxydant uniquement. Les graphiques en nuage de points, indiquent la position des nucléoïdes marqués au Dapi en fonction de la taille de la cellule et des conditions de stress. On observe que quelles que soient les conditions les cellules nouvellement nées présentent 1 nucléoïde et une taille minimum de 1,6 μ m alors que les cellules en division présentent 2 nucléoïdes et une taille de 4 μ m maximum (B à E).

Nous avons dans un deuxième temps essayé de compléter ces premiers résultats en utilisant les propriétés de fixation homogène sur le nucléoïde de la NAP majeure HU afin d'observer un marquage global du nucléoïde cette protéine se fixant de façon homogène (Tas et al., 2015). Une protéine hybride *hupA*-mCherry ou *hupA*-Gfp a précédemment été utilisée pour visualiser le nucléoïde d'*E. coli* notamment (Fisher et al., 2013). Nous avons construit une fusion entre la mCherry et la sous unité α de la protéine HU de *D. dadantii* mais il nous été impossible de remplacer l'allèle sauvage par cette construction malgré plusieurs tentatives utilisant des méthodes variées couramment mises en œuvre au laboratoire (culture en milieu carencé en phosphate, utilisation d'une cassette d'empoisonnement saccharose, voir section matériel et méthode), (figure 54).

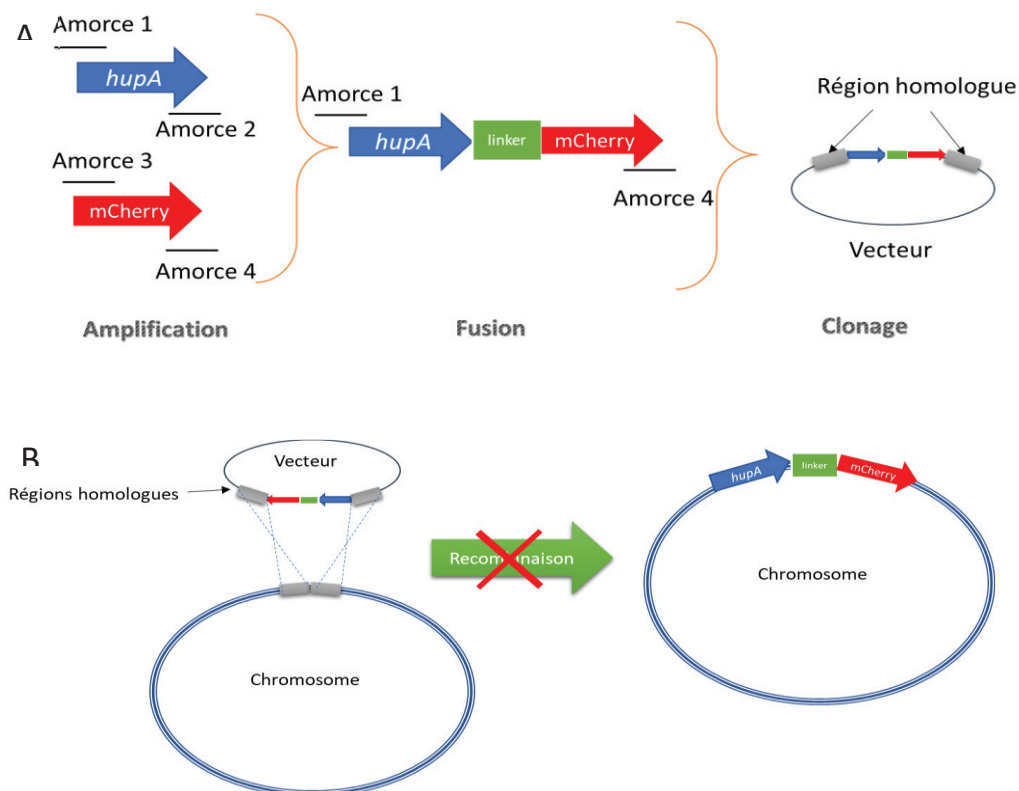


Figure 54 : Stratégie de marquage de la NAP HU. En se basant sur la bibliographie une fusion a été obtenue en amplifiant les gènes codant les protéine HupA (codant pour la sous unité α de la protéine HU) et mCherry par la méthode de PCR en trois fragments. Cette fusion a été clonée dans un plasmide possédant une insertion avec des régions homologue au gène *hupA* dans le génome de *Dickeya dadantii* (A). La dernière étape consiste à mettre en culture bas phosphate des cellule de *D.dadantii* transformée avec le plasmide cloné afin de forcer la recombinaison homologue et d'intégrer la construction au génome (voir matériel et méthode). C'est cette dernière étape d'intégration de la fusion dans le génome de *D.dadantii* qui n'a pu être réalisée.

Cette stratégie a été également réalisée avec une cassette d'empoisonnement *sacB*. La recombinaison à fonctionner dans ces conditions mais la souche de *Dickeya* obtenue était totalement malade et très muqueuse. Ceci indique l'accumulation de mutation secondaire fréquente avec ce système. L'observation au microscope à confirmer le mauvais état de cette souche. Nous nous sommes donc contenté des résultats de la coloration au Dapi en attendant de trouver une méthode alternative permettant de réaliser la construction. Un système utilisant la nucléase Cas9 est actuellement en cours de développement.

7) Analyse du profil de ségrégation de différents loci chromosomique chez *D. dadantii*

A) Observation du chromosome de *Dickeya dadantii* dans les conditions standard

L'analyse de la localisation des locis dans les conditions basales nous permet d'observer le positionnement du nucléoïde dans des cellules vivantes au cours de la croissance. L'analyse de la localisation des spots de fluorescence dans l'axe longitudinal de la cellule permet de visualiser la réplication et la ségrégation du locus étudié. En condition de croissance lente, il y a au maximum deux origines de réplication dans la même cellule. En condition de croissance plus rapide, il y a un chevauchement des différents cycles, on se retrouve avec des cellules ayant au minimum deux origines de réplication par cellule et pouvant avoir jusqu'à quatre origines de réplication par cellule.

L'étude de la réplication-ségrégation du chromosome de *D. dadantii* a été initiée grâce au marquage des couples *ousA/fliT* et *pelA/pelB*. Le pourcentage de cellules comportant un ou deux spots de fluorescence a été analysé en fonction de la position de ces loci. L'analyse microscopique permet de visualiser les spots de fluorescence, correspondant aux différents loci marqués, au sein des cellules (figure 55).

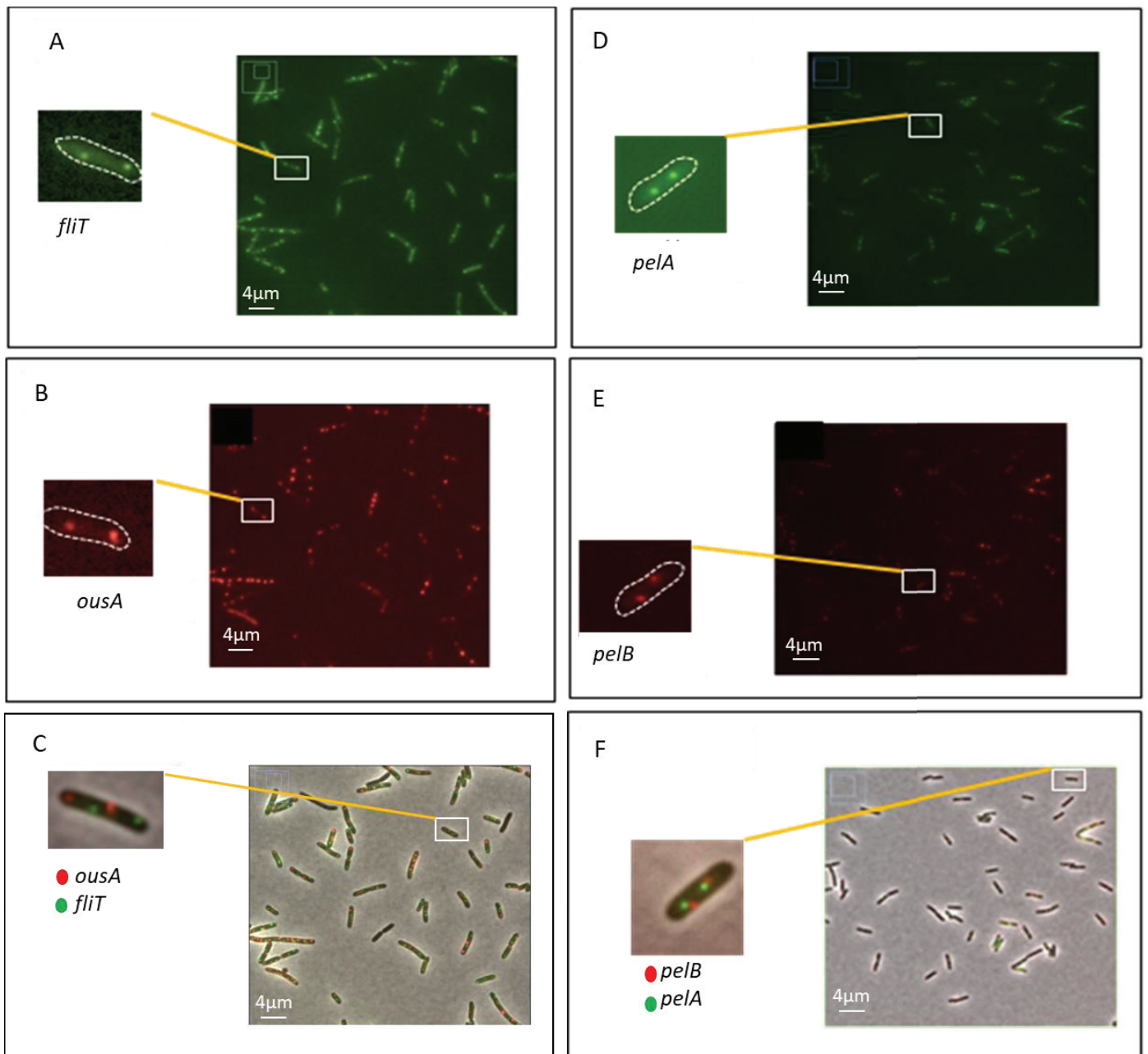


Figure 55 : Observation au microscope à fluorescence des souches de *Dickeya dadantii* marquées grâce à des étiquettes *parS*. Chacun des marquages est observé sur cellule unique ainsi que sur un champ large contenant de nombreuses cellules afin de vérifier l'homogénéité des marquages. Le locus *fliT*::*parSpMT1*-CmR est marqué à la GFP (A), le locus *ousA*::*parSP1*-RifR à la RFP-mCherry (B), la superposition des deux images afin d'observer les doubles marquages *fliT*-GFP et *ousA*-RFP-mCherry (C): ces deux loci apparaissent distants dans la cellule. De la même façon le locus *pelA*::*parSpMT1*-CmR est marqué à la GFP (D), le locus *pelB*::*parSP1*-RifR est marqué à la RFP-mCherry (E). Et la superposition des deux images afin d'observer les doubles marquages *pelA*-GFP et *pelB*-RFP-mCherry (F) : ces deux loci apparaissent proches dans la cellule.

Les loci *ousA* et *fliT* sont réplicore gauche pour *fliT* (L10) et sur le réplicore droit pour *ousA* (R2) et sont distincts de *oriC* de 1870kb pour *fliT* et de 1600kb pour *ousA* ; *fliT* est localisé à 640kb du site *dif* et *ousA* est distant de 800kb. Les loci *pelB* et *pelA* sont localisés sur le réplicore gauche et sont plus proche de *oriC*, 500kb et 1300kb ; *pelB* distant de 2000kb du site *dif* et *pelA* de 1160kb (figure 56).

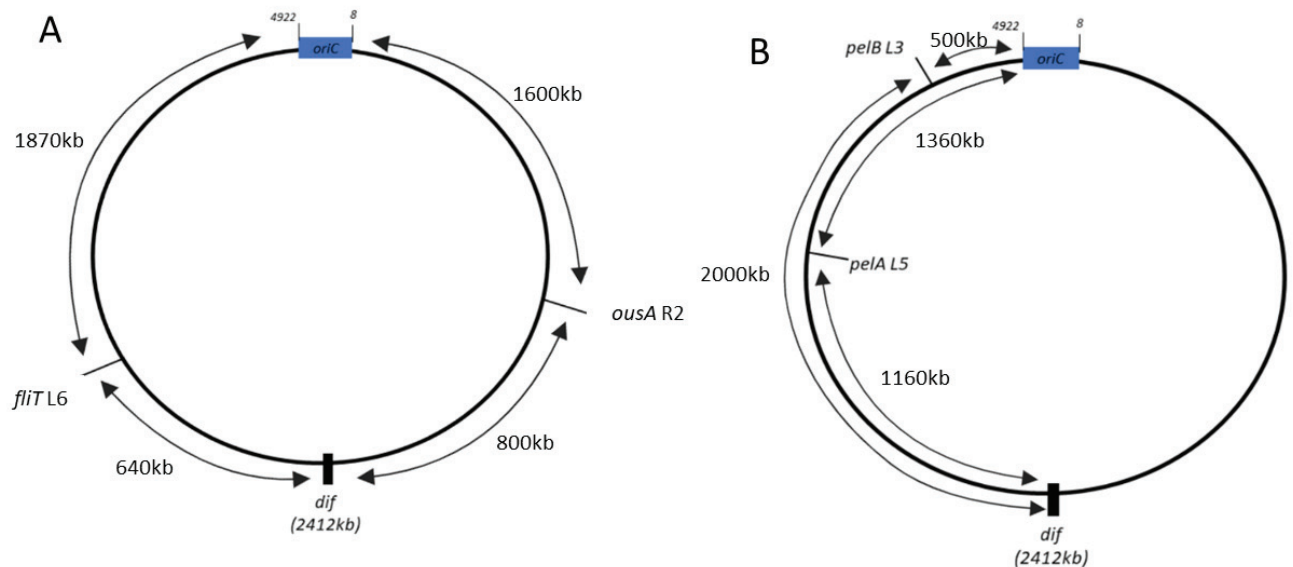
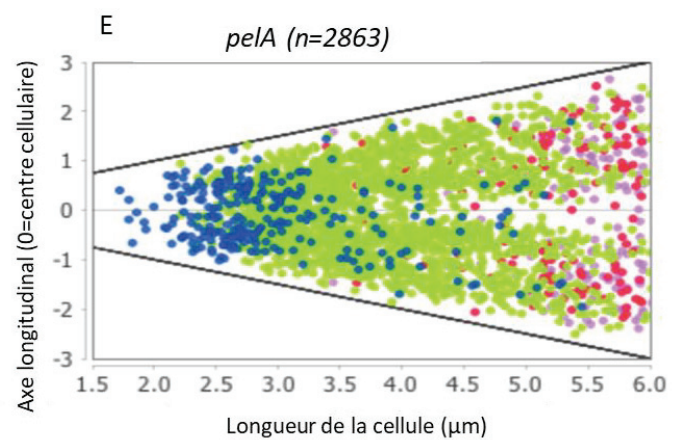
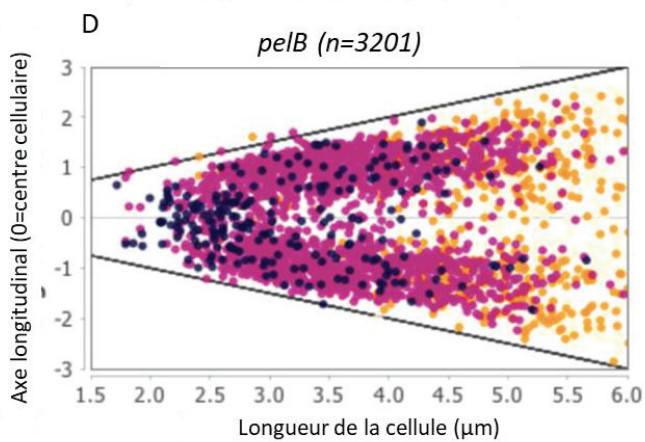
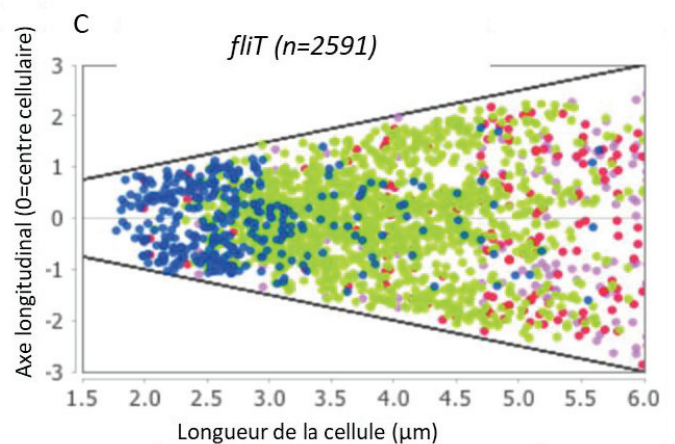
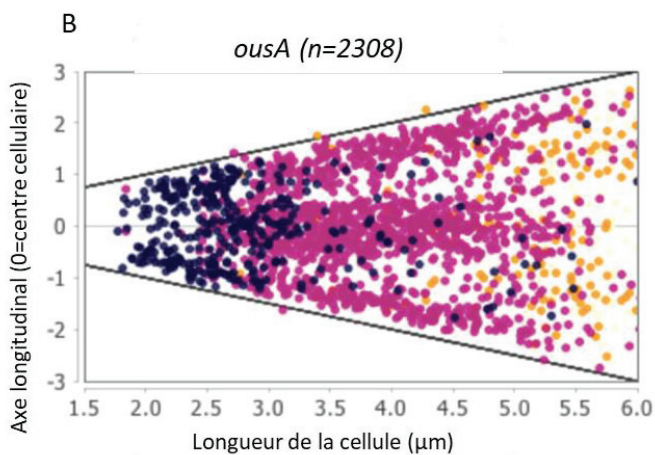
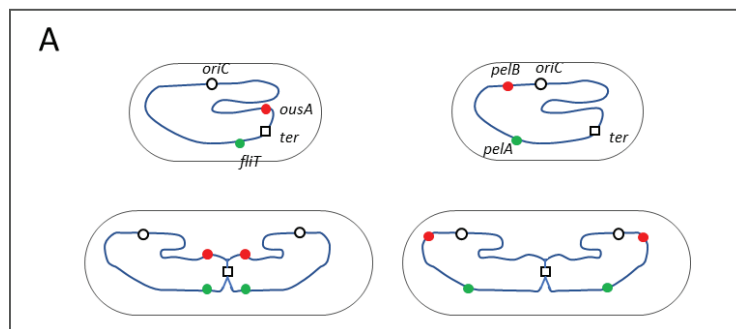


Figure 56 : Localisation des insertions des gènes marqueurs sur le chromosome. Les loci *ousA* et *fliT* sont situés respectivement sur le réplicore gauche et droit (A). Les loci *pelB* et *pelA* sont tous les deux localisés sur le réplicore droit.

Chez *D. dadantii*, lorsqu'on analyse les cellules à deux spots du locus *ousA*, correspondant à une réplication-ségrégation des deux loci frères *ousA*, deux types de positions distinctes sont observées : les loci frères ségrégent en position $-1/3$ et $+1/3$ par rapport au centre de la cellule ou bien ils restent en position centrale même lorsque les cellules sont grandes suggérant l'existence d'une cohésion post-réplivative majoritaire des loci frères *ousA* au centre de la cellule (figure 57). Ceci traduit une réplication tardive de *ousA* et une proximité du site *dif*. Le même type de répartition est observé pour le locus *fliT*. Pour le locus *pelB*, les loci frères ségrégent en position $-1/3$ et $+1/3$ par rapport au centre de la cellule (figure 57) et ils ne restent pas en position centrale ceci traduit une réplication-ségrégation précoce et une proximité du site *oriC*. Pour le locus *pelA*, on observe aussi une ségrégation des loci frères en position $-1/3$ et $+1/3$ mais la ségrégation est un peu plus tardive que pour *pelB* (figure 57).

En absence de stress, on a donc des comportements de ségrégation différents des loci *ousA-fliT* et des loci *pelA-pelB*. Les loci *fliT* et *ousA* sont localisés sur le réplicore gauche pour *fliT* et droit pour *ousA* et sont distants de *oriC* de 1900 kb pour *fliT* et 1600 kb pour *ousA* (figure 57). Ils sont donc répliqués tardivement et se retrouvent proches du centre de la cellule. En revanche, les gènes *pelB* et *pelA* localisés sur le réplicore gauche sont plus proches de *oriC*, 500 kb et 1300 kb, respectivement ; ils sont donc répliqués avant *fliT* et *ousA* et sont ségrégés plus rapidement.



● 1 spot
● 2 spots
● 3 spots
● 4 spots

● 1 spot
● 2 spots
● 3 spots
● 4 spots

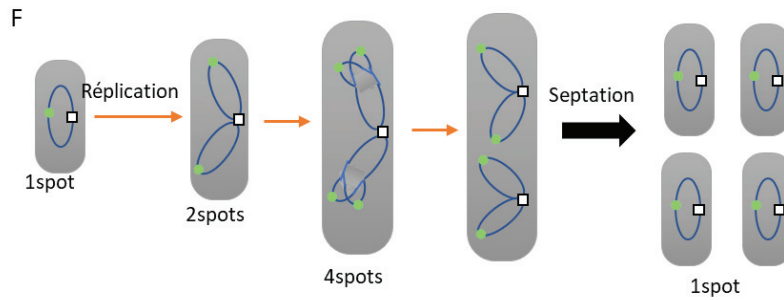


Figure 57 : Ségrégation chromosomique des loci. Chez *Dickeya dadantii* l'orientation du chromosome est dépendant du cycle cellulaire, donc une cellule en cours de division subira une réorientation du chromosome. En effet le chromosome est répliqué à partir de l'origine vers le terminus de réplication donc des gènes tel que *ousA* et *fliT* localisés vers le terminus seront spatialement proche en fin de réplication alors que des gènes tel que *pelB* situé proche de l'origine sera ségrégué précocement et *pelA* qui est à mi-distance de *oriC* et *ter* sera ségrégué de manière intermédiaire par rapport à *pelB* et par rapport au couple *ousA/fliT* (A). Les graphiques en nuage de points permettent l'observation des différents loci chromosomiques marqués au sein de la cellule. Les localisations des gènes marqués avec une étiquette *parSP1-RifR* sont à gauche et les gènes marqués avec des étiquettes *parSpMT1-CmR* sont à droite. Les couleurs sont représentatives du nombre de spots dans chaque cellule et reflètent la réplication et la ségrégation des loci frères. Les cellules s'allongent au cours du cycle cellulaire : les cellules nouvellement nées mesurent environ 1,5 μm de pôle à pôle et possèdent un chromosome unique non répliqué (cellules à un spot), en fin de cycle juste avant la division en deux cellules filles, la bactérie mesure environ 5 μm et contient jusqu'à quatre spots. Sur les graphiques est représenté la taille de la cellule en μm et la position des spots de fluorescence le long de l'axe longitudinal de la cellule d'un pôle à l'autre (+3/-3). Le nombre de spot présent dans la cellule est représentatif de son avancé dans le cycle cellulaire et est le témoin de la réplication-ségrégation progressive du chromosome au cours de la division (F).

La réplication-ségrégation des loci indique une position centrale de l'origine et du terminus de réplication avec des bras chromosomiques droit et gauche localisés dans les moitiés des cellules opposés. Ce mode de ségrégation-réplication est comparable à ce qui est observé chez la bactérie modèle *E.coli*.

B) Les loci *pelA-pelB* ne sont pas spatialement colocalisés dans nos conditions expérimentales

Comme précédemment indiqué dans la section bibliographique, l'utilisation d'outil bio-informatique suggérait que les gènes *pels*, localisés à différents endroits du chromosome, sont distribués périodiquement sur le génome de manière à former un "archipel" unique, supposer les rapprocher de manière à synchroniser leur régulation par le répresseur KdgR mais également favoriser leur sécrétion concertée (figure 58). Afin de tester cette hypothèse, les loci *pelA* et *pelB* ont été marqués et analysés sur des cultures en phase exponentielle de

croissance en milieu minimum sans pectine afin d'observer une éventuelle colocalisation 3D de ces deux gènes via la mesure de la distance interfocale.

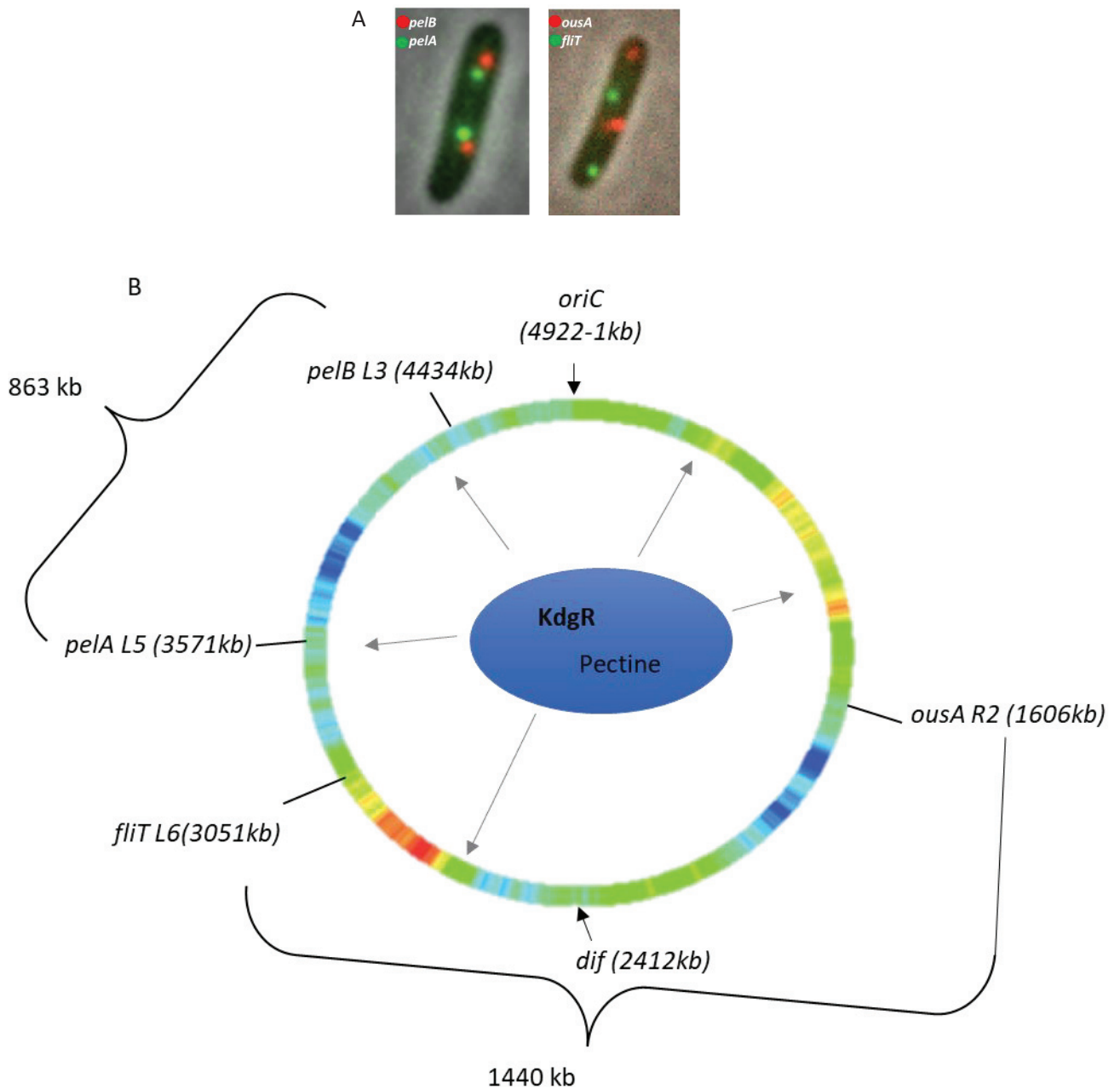


Figure 58 : Localisation des spots en fonction de la position des gènes sur le chromosome. Grâce à des images de microscopie on observe que les spots de fluorescence des loci *pelA* et *pelB* sont proche dans la cellule alors que les spots pour les loci *ousA* et *fliT* sont éloignés (A). Le schéma représente la position des gènes *pelA*, *pelB* et *fliT* sur le réplicore gauche et du gène *ousA* sur le réplicore droit. Les distances entre les gènes *pelA* et *pelB* ainsi qu'entre *ousA* et *fliT* sont représentées.

Dans ces conditions de croissance, les gènes *pelB* sont faiblement exprimés laissant présager une action importante des systèmes de répression dont KdgR. En absence de stress, la distance interfocale entre *pelB* et *pelA* pour la majorité des cellules est d'environ 0,45 μm (figure 59 A,D). A titre de comparaison, dans les mêmes conditions, la distance interfocale entre *fliT* et *ousA* est d'environ 0,7 μm (figure 59 C). Le repliement du chromosome pouvant être modifié par les conditions environnementales, nous avons mesuré la distance interfocale entre *pelA* et *pelB* en condition de stress. En présence d' H_2O_2 , on observe une diminution de la distance interfocale *pelB-pelA*. En revanche, en condition de stress osmotique, cette distance est plus fluctuante et peut aller jusqu'à 1,5 μm . Ainsi quelles que soient les conditions expérimentales testées, ces deux loci apparaissent comme deux entités distinctes dans la cellule ce qui réfute la colocalisation 3D prédite par le modèle informatique dans les conditions de faible expression.

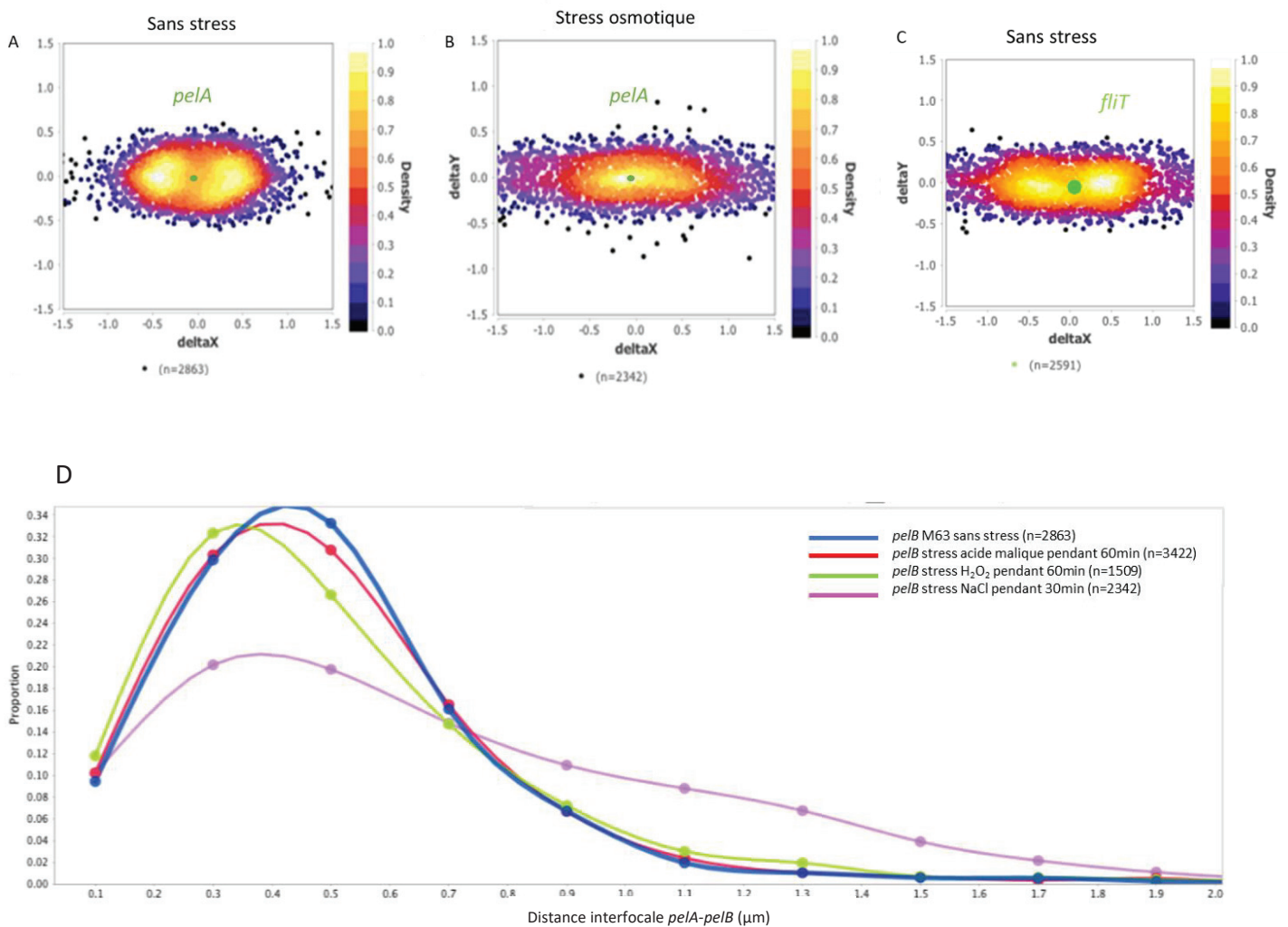


Figure 59 : Localisation du gène *pelB* par rapport au positionnement du gène *pelA*. Les graphiques en nuage de point ont été générés en plaçant comme repère au centre des graphiques et en zéro des axes x et y la position de *pelA*. Chaque point du nuage correspond à la position du gène *pelB* par rapport à *pelA* dans une cellule. Les panneaux A et B représentent la localisation des spots de fluorescence de *pelB* par rapport à *pelA* en absence de stress et en condition de stress osmotique respectivement. Le panneau C représente la localisation du gène *fliT* par rapport au gène *ousA* dans les cellules à titre de comparaison. Le nombre (n) de cellules observées est indiqué sous chaque panneau. La courbe D présente la proportion de cellules dont la distance inter-focale *pelA-pelB* est indiquée sur l'axe x. En absence de stress, la majorité des cellules présente une distance de 0,45 μm entre les deux loci. Les locis *pelB* et *pelA* restent distants quelle que soient les conditions.

L'induction de l'expression des gènes *pels* ayant lieu durant la phase de transition exponentielle/stationnaire, notamment en présence de composés pectiques, il faudra reproduire ces expériences durant cette phase de croissance afin d'apprécier la colocalisation des gènes *pels* dans ces conditions de forte induction. Les problèmes d'instabilité particulièrement marqués durant cette phase de croissance ne nous ont pas permis de réaliser ces investigations. Des alternatives, consistant à utiliser des conditions de croissance en chimostat (Sepulchre et al., 2019) sont envisagés pour résoudre ce problème.

8) Impact des stress environnementaux sur la localisation subcellulaire des loci

Comme précédemment indiqué dans la partie bibliographique, *D. dadantii* est confrontée à des environnements changeants durant le processus infectieux. Parmi ces conditions, les stress acide, osmotique et oxydant représentent des défis auxquelles la bactérie doit faire face en mettant en œuvre différents processus dont des reprogrammations génétiques. Nous avons reproduit en culture synthétique ces conditions de stress afin d'en apprécier l'impact sur la localisation subcellulaire de différents loci impliqués dans l'acclimatation à ces conditions. Notons que l'une de nos hypothèses de travail est qu'un gène fortement exprimé se retrouve en périphérie du nucléoïde et se rapproche de la périphérie de la cellule alors qu'un gène peu exprimé se retrouve au cœur du nucléoïde et donc au centre de la cellule.

A) Analyse du couple *pelA/pelB* dans les différentes conditions de stress

Nous avons dans un premier temps analysé les déplacements des loci *pelB* et *pelA*, portée par une même cellule, sachant que l'expression du contrôle *pelB* est stable dans toutes les conditions de stress étudiées et que *pelA* est sensiblement réprimé par les stress osmotique et oxydant (4 et 5 fois, respectivement figure 42) et induit par le stress acide (20 fois). Le locus *pelA* est localisé dans le domaine d8 (globalement induit par le stress oxydant et réduit par le stress acide) et *pelB* est localisé dans le domaine d9 (qui ne présente pas de réponse particulière au stress acide, osmotique et oxydant).

Comme espéré, aucune relocalisation subcellulaire du locus *pelB* n'est observée quel que soit le stress appliqué (figure 60). Cette observation associée à celles des loci *oriC* et *ter* ainsi que la coloration au Dapi indiquent que le nucléoïde ne subit pas de modifications morphologiques importantes dans les conditions étudiées. Par ailleurs, la stabilité d'expression de *pelB* est corrélée à une localisation stable de ce locus au sein de la cellule. En revanche pour *pelA*, en cohérence avec les données d'expression, une relocalisation vers le centre est observée après l'application des stress osmotique et oxydant, avec un effet plus prononcé dans le cas du stress osmotique (figure 61).

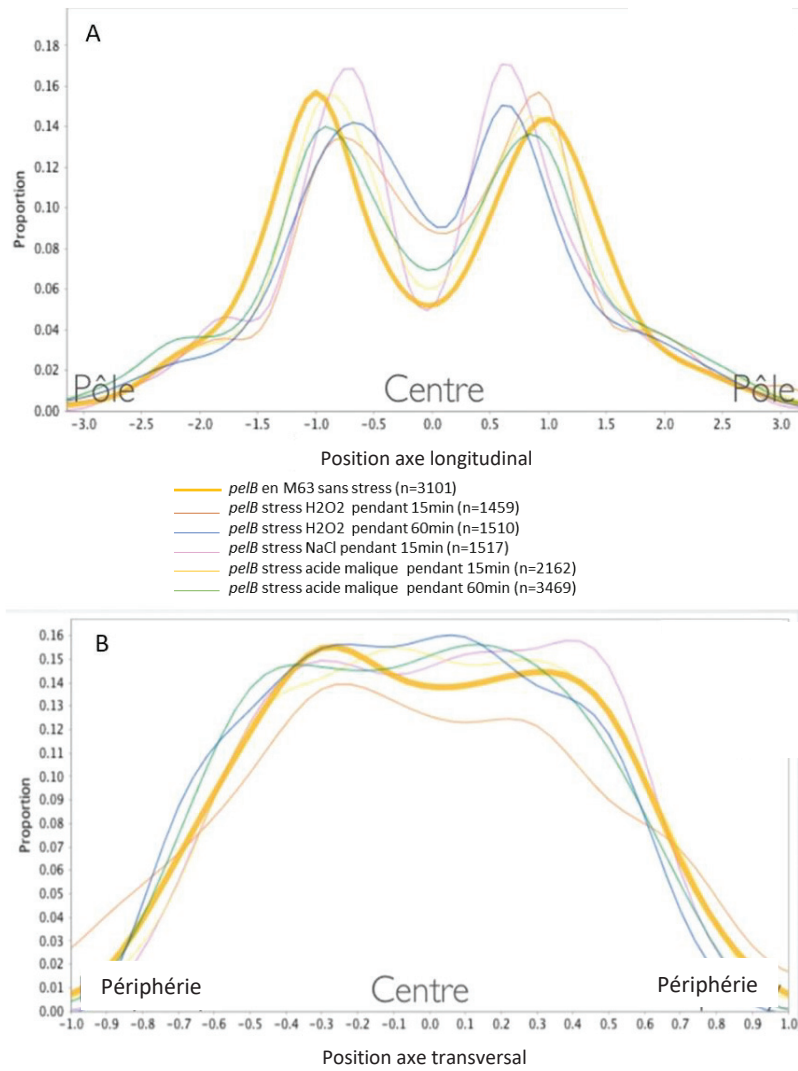


Figure 60 : Localisation du locus *pelB* en fonction des stress appliqués. La taille des cellules a été normalisée de -3 à +3 dans l'axe longitudinal (A) et de -1 à +1 dans l'axe transversal (B). Le nucléoïde n'occupe pas la totalité du volume cellulaire. En absence de stress, on observe une localisation majeure des spots *pelB* en position -1/3, +1/3 de la cellule dans l'axe longitudinal. Cette localisation est conservée quelle que soit le stress appliqué. n correspond au nombre de cellules analysées. En jaune et en trait épais sont présentés les résultats obtenus sur des cellules en condition standard.

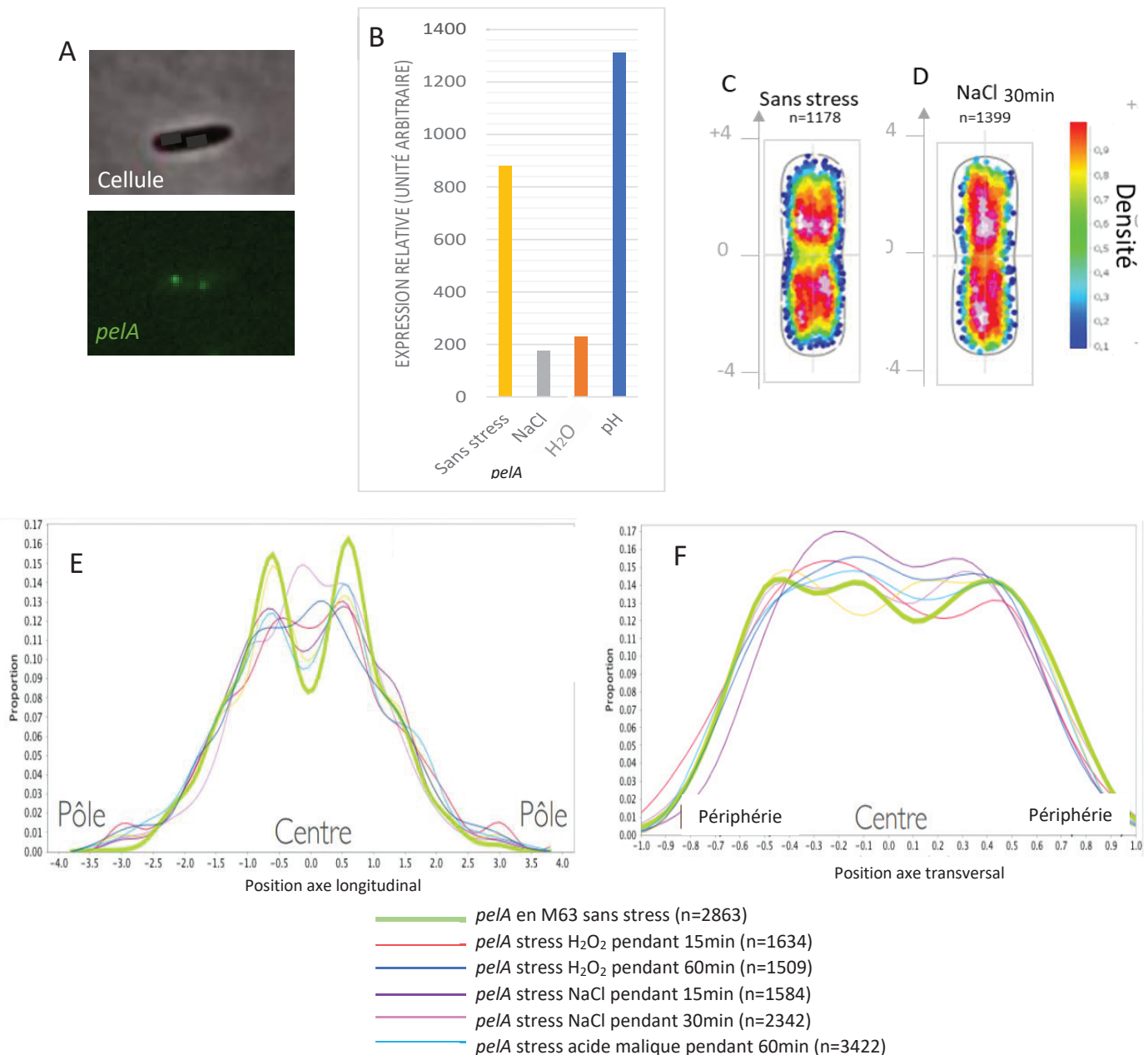


Figure 61 : Localisation du locus *pelA* dans les différentes conditions. Le gène *pelA* est marqué par une étiquette *parSpMT1* et observé en vert par la GFP (A). L'histogramme représente l'expression relative de *pelA* en fonction des conditions de stress obtenu grâce à des puces à ADN (B), on observe que *pelA* est fortement exprimé dans le cas d'un stress acide médié par l'acide malique 36mM à pH5 et réprimé dans le cas des stress osmotique et oxydant. Les cartes de densité de spots montrent la localisation des spots de fluorescence dans le nucléoïde qui n'occupe pas à la totalité des cellules dont la taille à été normalisée. Les couleurs blanche et rouge indiquent qu'un grand nombre de cellules présente un spot localisé à cette position subcellulaire et la couleur bleue que seul un faible nombre de cellules possèdent un spot à cet endroit. Pour le gène *pelA* on observe deux foyers rouges de haute densité de spots de fluorescence en absence de stress (C) et un étalement du signal en présence de NaCl 0,3M (D). Les graphes E et F représentent, respectivement, la proportion des spots de fluorescence dans la longueur et dans la largeur de la cellule dans les différentes conditions de stress testées. Ils indiquent une relocalisation des spots de la périphérie vers le centre dans le cas des stress osmotique (15min, notamment) et légèrement dans le cas d'un stress oxydant. n correspond au nombre de cellules analysées. En vert et en trait épais sont présentés les résultats obtenus sur des cellules en condition standard.

B) Analyse du couple *ousA/fliT* marqueur des stress osmotique

Dans cette première série d'étude, nous avons retenu le couple *ousA-fliT*, pour analyser l'impact du stress osmotique qui donne des résultats d'expression relativement contrastés (voir figure 42). *OusA* est fortement activé par le stress osmotique alors que l'expression de *fliT* est réprimée dans cette condition (figure 42). Pour le locus *ousA*, en absence de stress, les spots de fluorescence sont majoritairement localisés au centre de la cellule dans l'axe longitudinal avec deux localisations secondaires plus proches des pôles. En condition de stress osmotique, lorsque le gène *ousA* est fortement exprimé, la majorité des spots est redirigée vers les pôles de la cellule. On observe également une relocalisation plus subtile du locus *ousA* dans l'axe transversale de la cellule du centre vers la périphérie en réponse au stress osmotique. En d'autres termes, le locus *ousA* se déplace vers la périphérie du nucléoïde lorsque ce gène est fortement exprimé. Ce déplacement est spécifique du stress osmotique et n'est pas observé pour les autres types de stress (figure 62). En ce qui concerne le locus *fliT*, en absence de stress, on observe un gradient diffus de spots fluorescents depuis le centre vers les pôles. Quel que soit le stress appliqué sur les cellules, on observe une relocalisation des spots de fluorescence de la périphérie vers le centre de la cellule dans l'axe transversal des cellules, ceci est corrélé avec une diminution d'expression du gène *fliT* en stress osmotique et acide. L'induction modérée de *fliT* en stress oxydant n'est pas corrélée avec le déplacement observé de la périphérie avec le centre du nucléoïde (figure 63).

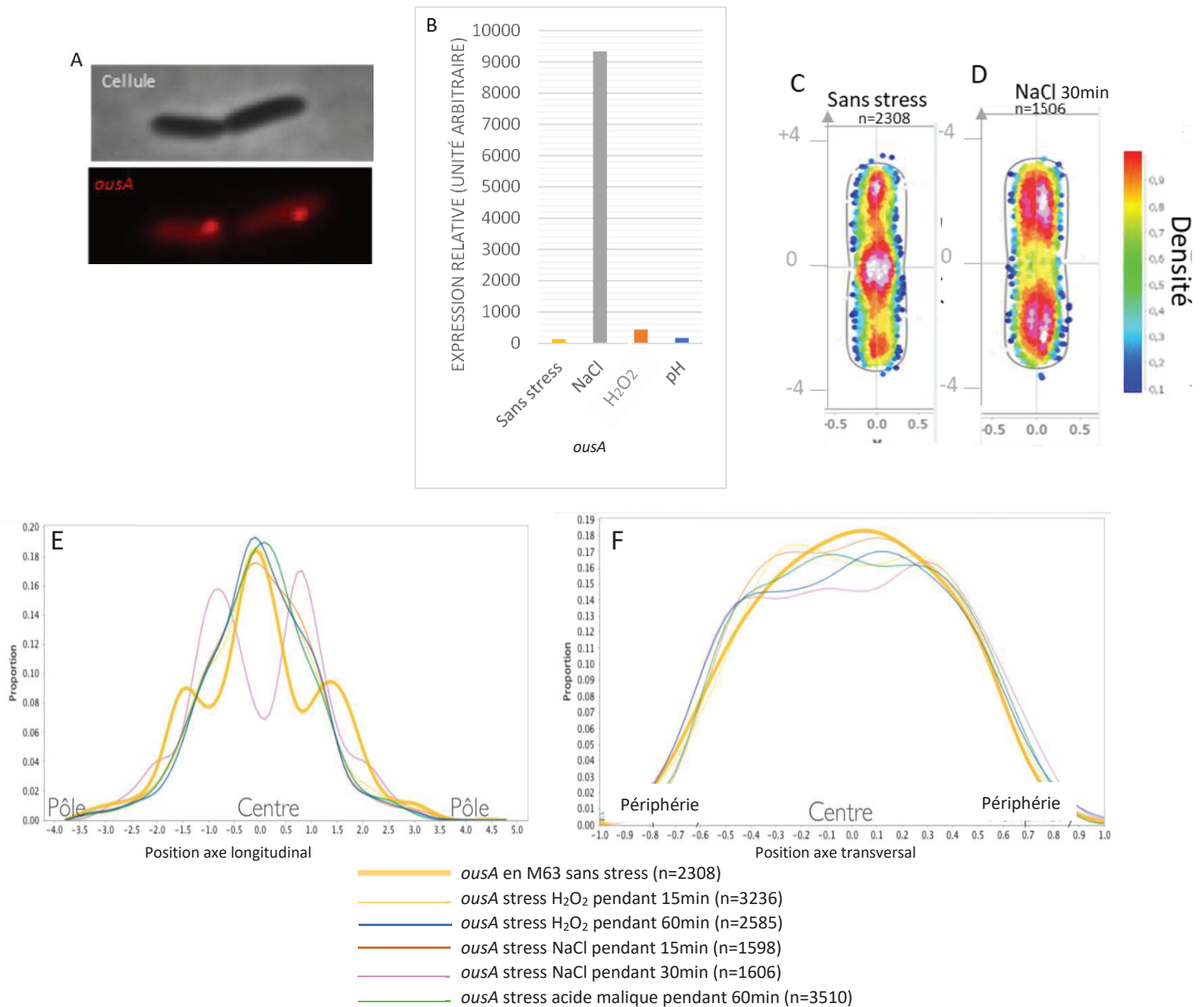


Figure 62 : Localisation du locus *ousA* dans les différentes conditions. Le gène *ousA* est marqué par une étiquette *parSP1* et observé en rouge par la RFP-mCherry (A). L'histogramme représente l'expression relative de *ousA* en fonction des conditions de stress obtenu grâce à des puces à ADN (B), on observe que *ousA* est fortement exprimé dans le cas d'un stress osmotique médié par le NaCl 0,3M. Les cartes de densité de spots montrent la localisation des spots de fluorescence dans le nucléoïde qui n'occupe pas à la totalité des cellules dont la taille a été normalisée. Les couleurs blanche et rouge indiquent qu'un grand nombre de cellules présente un spot localisé à cette position subcellulaire et la couleur bleue que seul un faible nombre de cellules possèdent un spot à cet endroit. Pour le gène *ousA* on observe un foyer rouge de haute densité de spots de fluorescence en absence de stress (C) et une relocalisation des spots en direction des pôles de la cellule en présence de NaCl 0,3M (D). Les graphes E et F représentent, respectivement, la proportion des spots de fluorescence dans la longueur et dans la largeur de la cellule dans les différentes conditions de stress testées. n correspond au nombre de cellules analysées. En jaune et en trait épais sont présentés les résultats obtenus sur des cellules en condition standard.

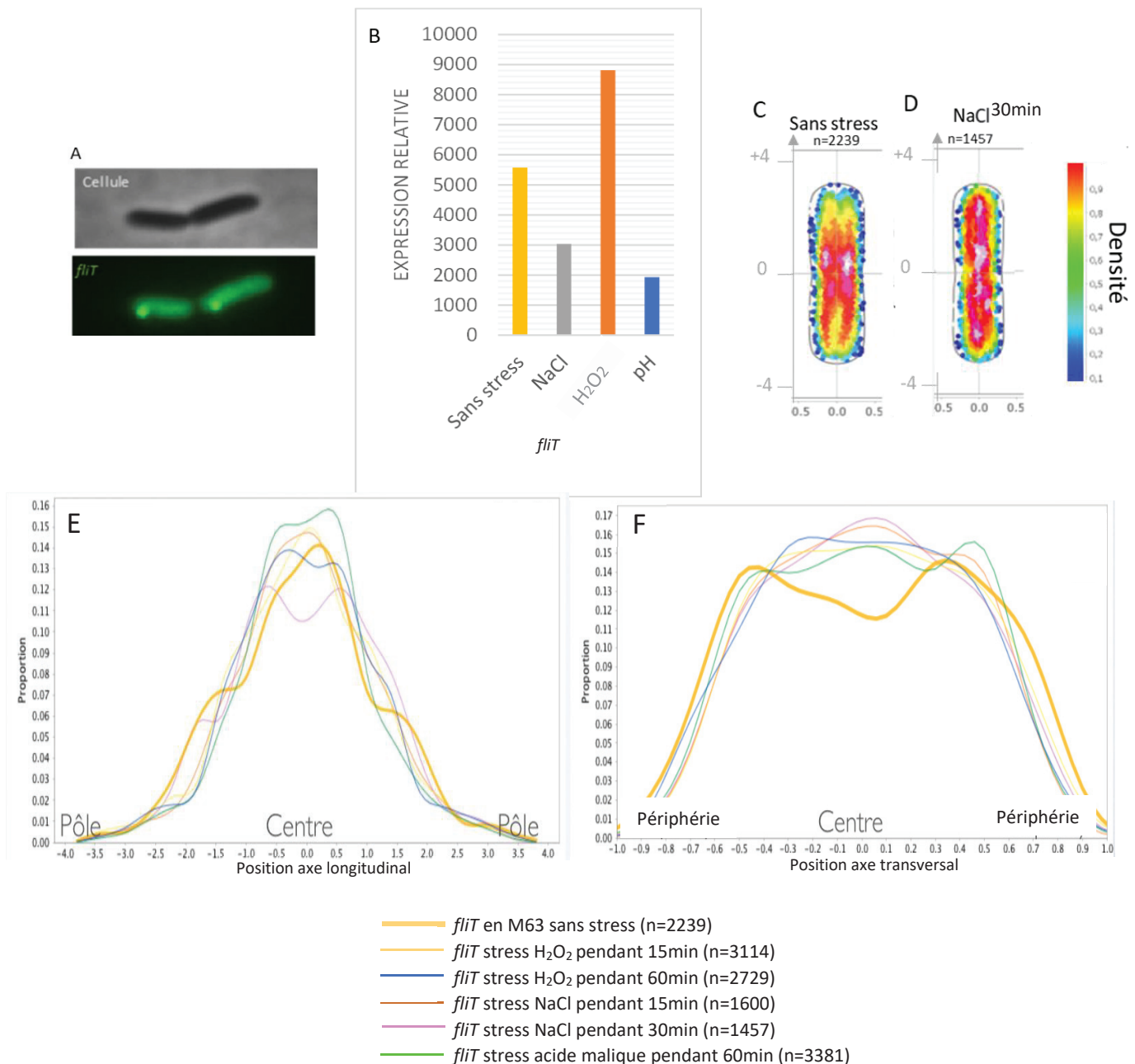


Figure 63 : Localisation du locus *fliT* dans les différentes conditions. Le gène *fliT* est marqué par une étiquette *parSpMT1* et observé en vert par la GFP (A). L'histogramme représente l'expression relative de *fliT* en fonction des conditions de stress obtenu grâce à des puces à ADN (B), on observe que l'expression de *fliT* est modérée dans le cas d'un stress oxydant médié par le H₂O₂ 100µM et moins exprimé dans le cas d'un stress osmotique par NaCl 0,3M (B) ainsi qu'en présence d'un stress acide induit par l'acide malique. Les cartes de densité de spots montrent la localisation des spots de fluorescence dans le nucléoïde qui n'occupe pas à la totalité des cellules dont la taille a été normalisée. La couleur blanche indique qu'un grand nombre de cellules présente un spot localisé à cette position subcellulaire et la couleur verte que seul un faible nombre de cellules possèdent un spot à cet endroit. Pour le gène *fliT* on observe un gradient diffus de spots de fluorescence en absence de stress (C) et une relocalisation des spots vers les pôles de la cellule en présence de NaCl 0,3M (D). Les graphes E et F représentent, respectivement, la proportion des spots de fluorescence dans la longueur et dans la largeur de la cellule dans les différentes conditions de stress testées. n correspond au nombre de cellules analysées. En jaune et en trait épais sont présentés les résultats obtenus sur des cellules en condition standard.

C) Le couple *asr* et *pggS*, marqueurs des stress acide et osmotique présentent une relocalisation modérée

Nous avons voulu renforcer les résultats obtenus avec le couple *ousA/fliT* en analysant un deuxième couple *asr/pggS*. *asr* est fortement induit par le choc acide alors que *pggS* est induit par le stress osmotique. Pour ces analyses nous avons utilisé une nouvelle version du logiciel ImageJ avec son extension MicrobeJ et une nouvelle représentation dite en « cylindre ». Cette représentation permet de diviser le nucléoïde en 4 espaces de volume équivalent du cœur qui correspond à l'espace 1 vers la périphérie qui correspond à l'espace 4. Après division le logiciel détecte et calcul de nombre de spots de fluorescence dans chacun des espaces ce qui nous permet de déterminer les mouvements des loci et ainsi de savoir si un locus se déplace vers le cœur ou la périphérie du nucléoïde en fonction des conditions. Cette nouvelle représentation a été préférée aux représentations précédentes dans les axes longitudinal et transversal qui représente la localisation sur les axes du nucléoïde mais sans l'aspect volumique (voir matériel et méthode).

Dans le cas d'*asr*, on constate un léger mais significatif déplacement des signaux du centre vers la périphérie en présence d'un choc acide, condition de forte expression de ce gène, alors que dans le cas des stress osmotique et oxydant les profils de répartition sont sensiblement similaires à ceux des conditions standard de croissance (figure 64). La figure 65 indique une induction de *pggS* par les stress osmotique et oxydant. Dans le cas du choc osmotique, on constate un léger déplacement des signaux du centre vers la périphérie en présence alors qu'une fluctuation sans tendance lisible est observée dans les cas des stress oxydant et acide. Ainsi donc une corrélation espérée est observée pour les loci *asr*. En revanche pour *pggS* seule une corrélation partielle est observée : relocalisation des spots en cohérence avec le niveau d'expression pour le choc osmotique mais pas de relocalisation significative en présence de stress oxydant. Ces résultats mitigés pourraient être liés à la proportion de cellules fluorescentes relativement faibles dans ces expériences.

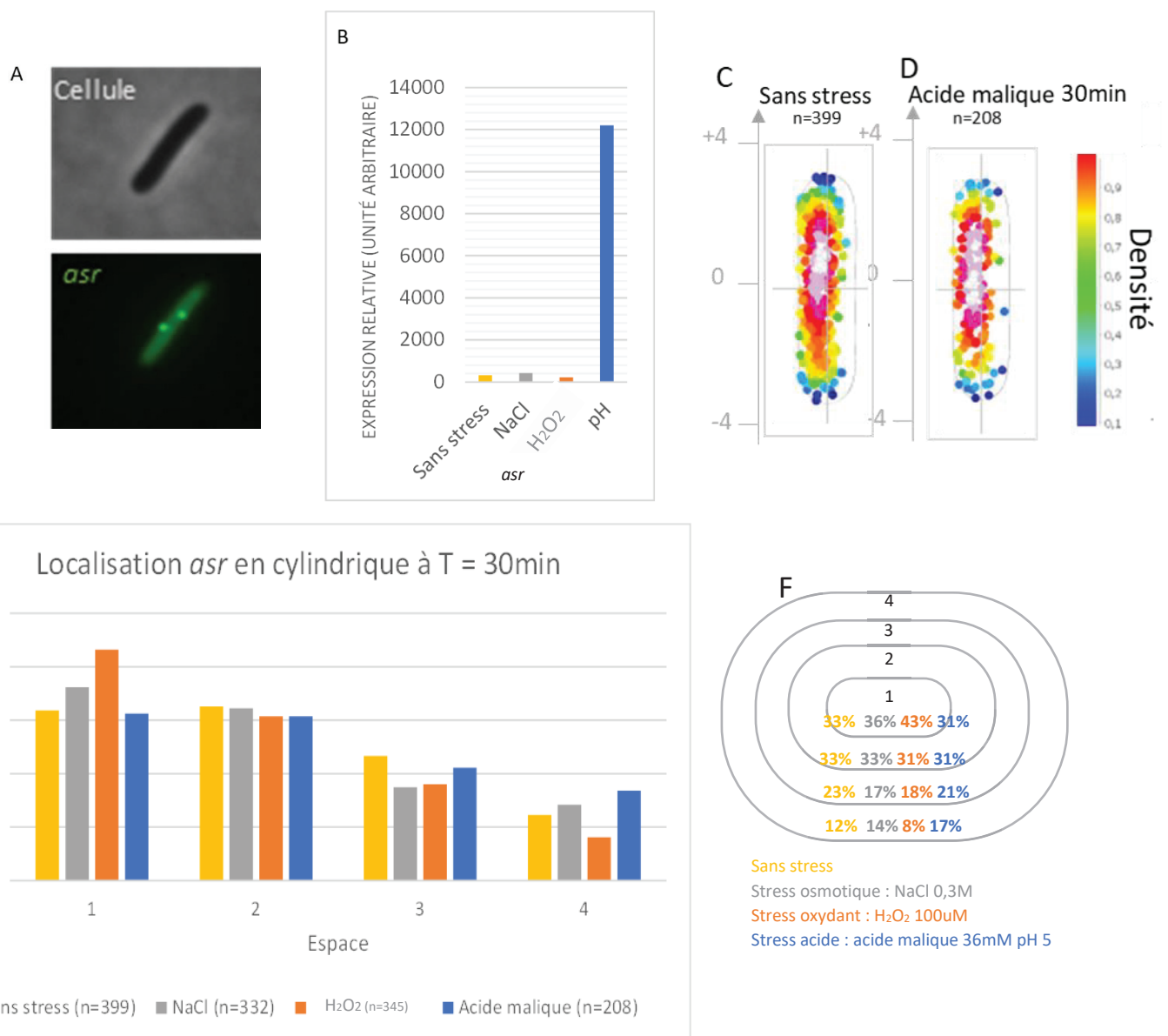


Figure 64 : Localisation du locus *asr* dans les différentes conditions. Le gène *asr* est marqué par une étiquette *parSpMT1* et observé en vert par la GFP (A). L'histogramme représente l'expression relative de *asr* en fonction des conditions de stress obtenu grâce à des puces à ADN (B), on observe que *asr* est fortement exprimé dans le cas d'un stress acide médié par l'acide malique à 36mM pour un pH 5. Les cartes de densité de spots montrent la localisation des spots de fluorescence dans le nucléoïde qui n'occupe pas à la totalité des cellules dont la taille a été normalisée. Les couleurs blanche et rouge indiquent qu'un grand nombre de cellules présente un spot localisé à cette position subcellulaire et la couleur bleue que seul un faible nombre de cellules possèdent un spot à cet endroit. Pour le gène *asr* on observe un gradient diffus de spots de fluorescence en absence de stress (C) et un étalement des signaux en présence d'acide malique 36mM (D). L'histogramme représente la proportion des spots de fluorescence dans les 4 espaces du nucléoïde allant du cœur (espace 1) à la périphérie (espace 4) dans les différentes conditions de stress testées (E). Le graphique représente le pourcentage de spots de fluorescence dans chacun des 4 espaces du nucléoïde. On observe un léger enrichissement des espaces 3 et 4 en présence d'acide malique traduisant une relocalisation des spots de *asr* du cœur du nucléoïde vers la périphérie dans le cas d'un stress acide.

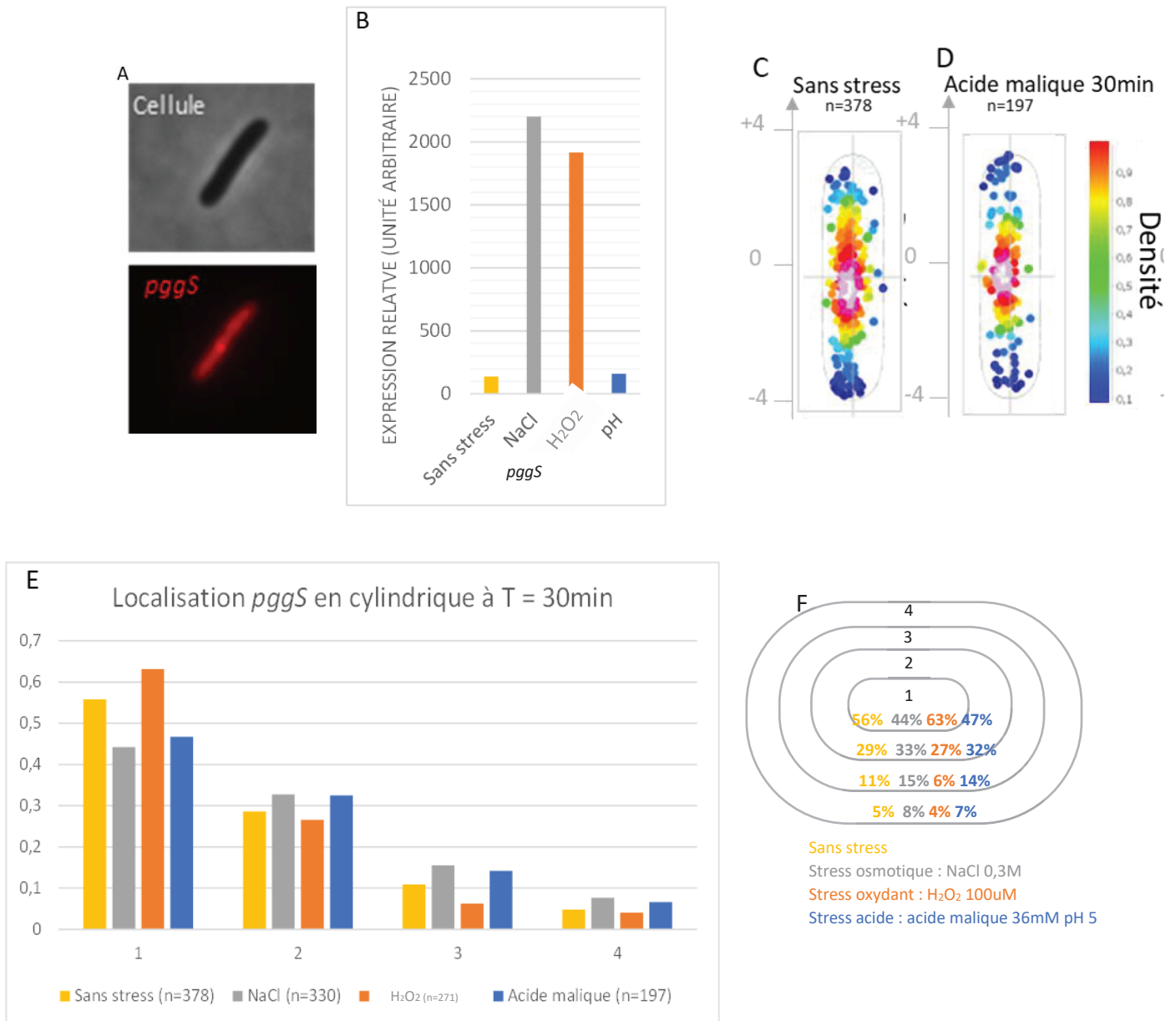


Figure 65 : Localisation du locus *pggS* dans les différentes conditions. Le gène *pggS* est marqué par une étiquette *parSP1* et observé en rouge par la RFP-mCherry (A). L'histogramme représente l'expression relative de *pggS* en fonction des conditions de stress obtenu grâce à des puces à ADN (B), on observe que *pggS* est fortement exprimé dans le cas d'un stress osmotique médié par le NaCl 0,3M et réprimé par l'acide malique à 36mM pour un pH 5. Les cartes de densité de spots montrent la localisation des spots de fluorescence dans le nucléoïde qui n'occupe pas à la totalité des cellules dont la taille a été normalisée. Les couleurs blanche et rouge indiquent qu'un grand nombre de cellules présente un spot localisé à cette position subcellulaire et la couleur bleue que seul un faible nombre de cellules possèdent un spot à cet endroit. Pour le gène *pggS* on observe un gradient diffus de spots de fluorescence en absence de stress (C) et une compaction des signaux en présence d'acide malique 36mM (D). L'histogramme représente la proportion des spots de fluorescence dans les 4 espaces du nucléoïde allant du cœur (espace 1) à la périphérie (espace 4) dans les différentes conditions de stress testées (E). Le graphique représente le pourcentage de spots de fluorescence dans chacun des 4 espaces du nucléoïde. On observe un léger enrichissement des espaces 3 et 4 en présence de NaCl traduisant une relocalisation des spots de *pggS* du cœur du nucléoïde vers la périphérie dans le cas d'un stress osmotique.

D) Le marqueur du stress oxydant *ahpC* présente un profil de réponse atypique

Le gène *ahpC* présente la particularité d'avoir un niveau d'expression basal très faible avec une très forte induction (plus de 1000 fois) en présence d'un stress oxydant. Cette particularité laissait présager des relocalisations très contrastées de ce locus dans cette condition de stress. De manière surprenante, des spots de fluorescence de ce locus n'ont été observés qu'en présence de stress oxydant (figure 66). Ce résultat du type « tout ou rien ou off/on » laisse supposer, qu'en absence de stress oxydant, ce locus est enfoui au cœur du nucléoïde, le rendant inaccessible aux protéines fluorescentes ParB. Pour vérifier cette hypothèse, nous avons réalisé des observations sur des cultures réalisées en présence de rifampicine, un antibiotique induisant la décompaction du nucléoïde via une inhibition de la fixation de l'ARN polymérase. Effectivement, dans ces conditions il y a apparition de spots de fluorescence confirmant l'hypothèse émise.

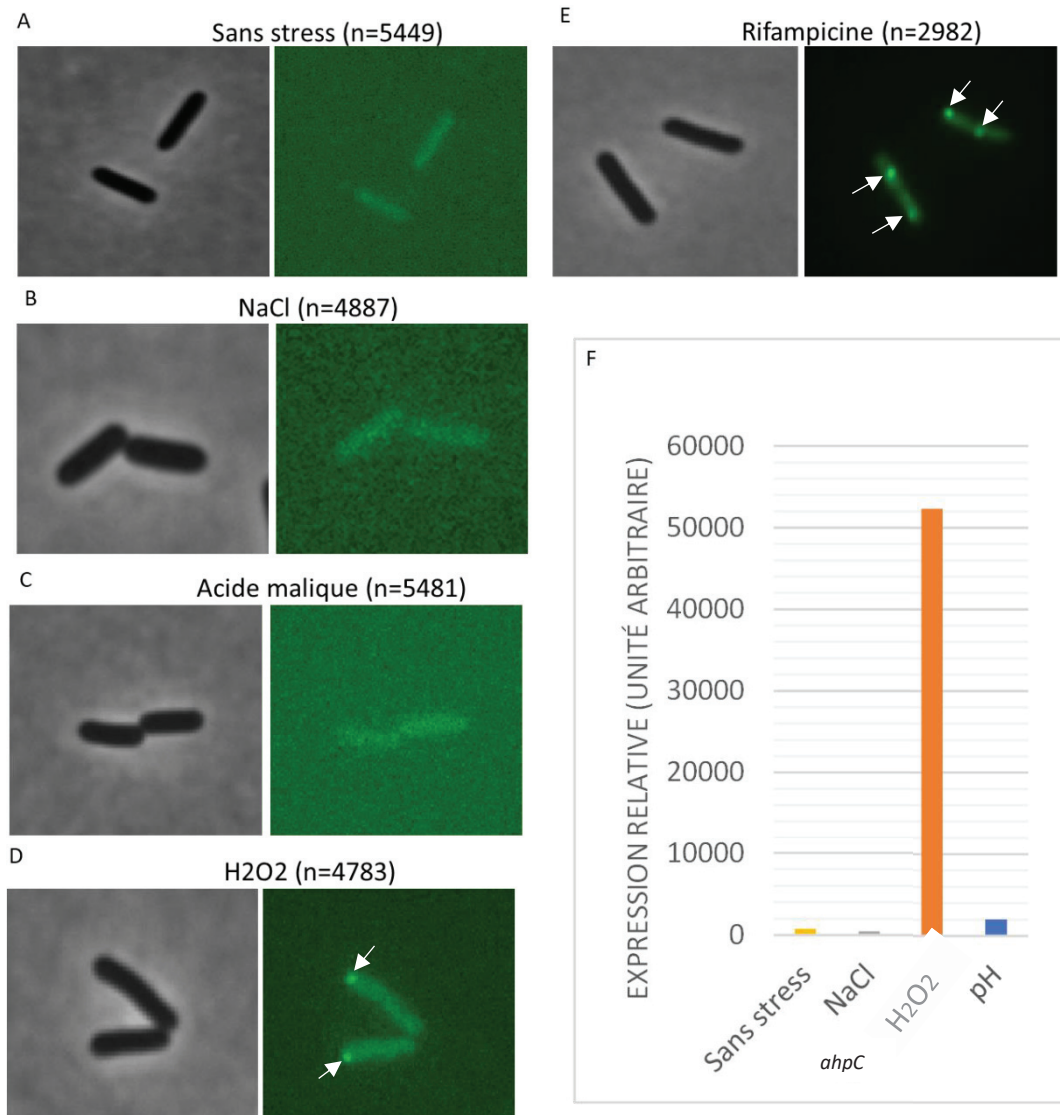


Figure 66 : Marquage et expression du locus *ahpC*. Le gène *ahpC* est marqué avec une étiquette *parSpMT1* et observé en vert par des spots de GFP. Dans les conditions standard (sans stress A), ainsi qu'en stress osmotique (B) et acide (C) les cellules ne présentent pas de spots de fluorescence. Après choc à l'H₂O₂ 100uM (D) et à la rifampicine 10ug/mL (E) des spots de fluorescence vert sont observable. Le graphique représente l'expression relative du gène *ahpC* dans les différentes conditions, on observe que le gène est surexprimé lors d'un stress oxydant (F).

Le loci à proximité de *kduI* a été utilisé comme marqueur additionnel pour l'induction par le stress oxydant. Ce gène est modérément exprimé et induit environ 4 fois en présence d'H₂O₂. Ce gène est localisé majoritairement dans les espaces 1 et l'espace 4 est peu peuplé quel que soit les conditions (figure 67). Lorsque l'on fait la somme des espaces 2 et 3 on observe un léger enrichissement en cas de stress oxydant traduisant une potentiel relocalisation du gène du centre vers la périphérie dans cette condition.

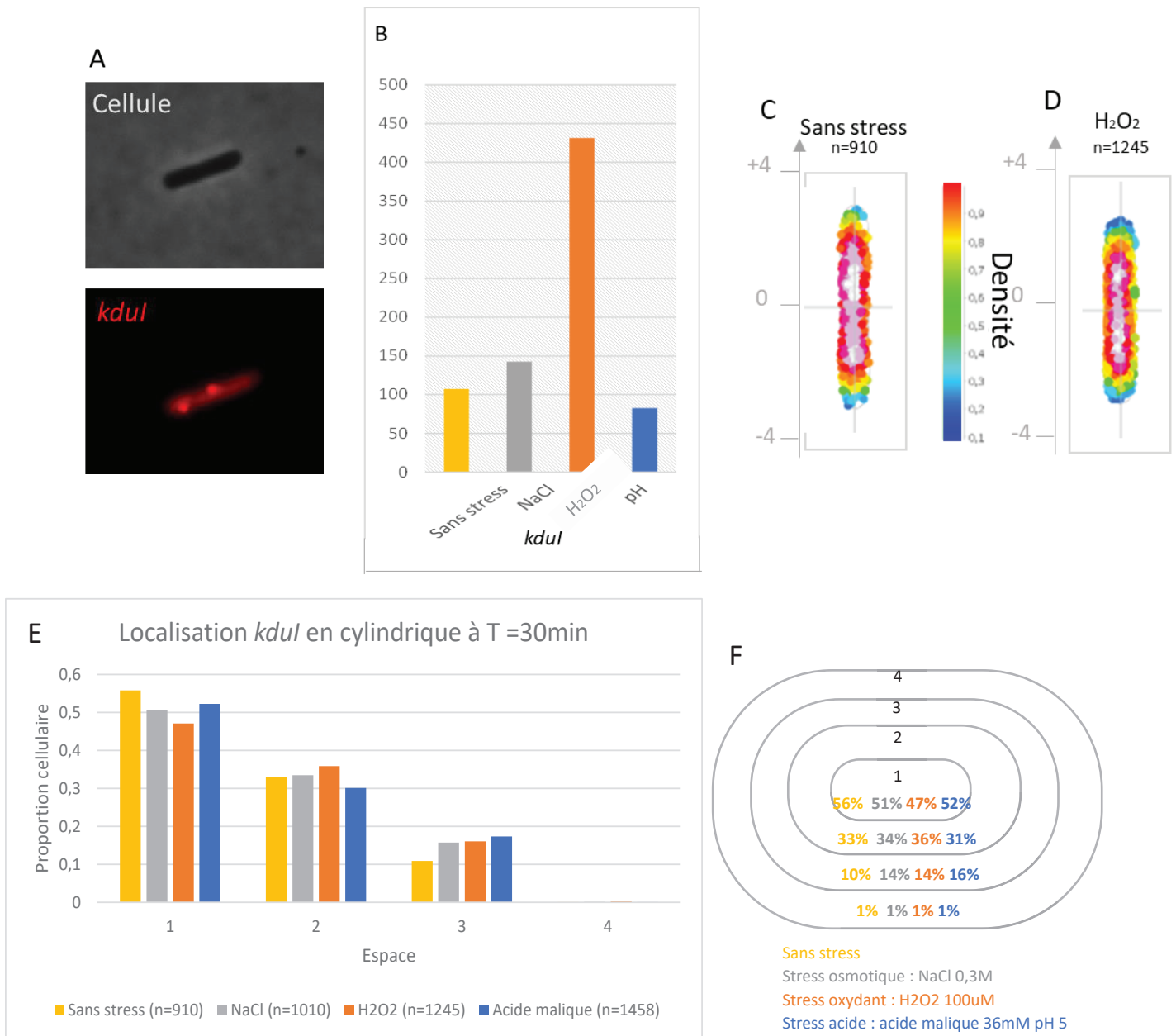


Figure 67 : Localisation du locus *kdul* dans les différentes conditions. Le gène *kdul* est marqué par une étiquette parSP1 et observé en rouge par la RFP-mCherry (A). L'historgramme représente l'expression relative de *kdul* en fonction des conditions de stress obtenu grâce à des puces à ADN (B), on observe que *kdul* est induit de 4 fois dans le cas d'un stress oxydant médié par le H₂O₂ 100µM, ce gène reste toutefois modérément exprimé. Les cartes de densité de spots montrent la localisation des spots de fluorescence dans le nucléoïde qui n'occupe pas à la totalité des cellules dont la taille a été normalisée. Les couleurs blanche et rouge indiquent qu'un grand nombre de cellules présente un spot localisé à cette position subcellulaire et la couleur bleue que seul un faible nombre de cellules possèdent un spot à cet endroit. L'historgramme représente la proportion des spots de fluorescence dans les 4 espaces du nucléoïde allant du cœur (espace 1) à la périphérie (espace 4) dans les différentes conditions de stress testées (E). Le graphique représente le pourcentage de spots de fluorescence dans chacun des 4 espaces du nucléoïde. On observe un léger enrichissement des espaces 2 et 3 en présence de H₂O₂ traduisant une relocalisation des spots de *kdul* du cœur du nucléoïde vers la périphérie dans le cas d'un stress oxydant. Ce gène restant faiblement exprimé, l'espace 4 est peu peuplé quel que soit les conditions analysées.

Partie IV : Discussion et perspectives

Il est de plus en plus évident que les différents niveaux d'organisation de l'ADN jouent un rôle dans la régulation de la transcription et qu'en retour la transcription affecte l'organisation du chromosome (Dame et al., 2020; Umbarger et al., 2011; Wiggins et al., 2010; Wray et al., 2018). La relation existante entre ces deux acteurs essentiels de l'expression génique peut être définie comme une "rue à double sens" (Dorman, 2019), étant donné l'interdépendance de ces processus. Ainsi, la transcription et la dynamique des chromosomes bactériens sont interconnectées et s'influencent mutuellement en fonction des conditions physiologiques et environnementales. Néanmoins, le rôle de la dynamique structurale du nucléoïde dans la modification de l'expression génétique, qui sous-tend la capacité des espèces bactériennes à s'acclimater rapidement à des fluctuations environnementales, demeure sous-estimée. Ces investigations ont été réalisées dans le but d'approfondir les connaissances dans ce domaine d'étude. Nous avons privilégié une stratégie associant des approches de génétique moléculaire et de microscopie à fluorescence de haute définition sur la bactérie phytopathogène *Dickeya dadantii* qui, comme précédemment indiqué, présente des atouts indéniables pour ce genre d'étude en raison notamment des études relativement avancées de l'impact des conditions environnementales sur la régulation de l'expression génique de cette bactérie (Jiang et al., 2015; Reverchon and Nasser, 2013). Globalement, des cassettes *parSP1* et *parSpMT1* ont été introduites dans différentes régions du chromosome par recombinaison homologue afin de suivre leur dynamique cellulaire grâce à une protéine ParB fusionnée à une protéine fluorescente. Cette stratégie ciblée permettant de travailler sur des cellules vivantes nous a semblé plus pertinente pour appréhender en temps réel les mouvements au sein du nucléoïde. En effet, les méthodes sans à priori permettant de visualiser des changements de la configuration du nucléoïde tel que le Hi-C ont l'inconvénient d'être réalisées dans des états figés. De ce fait, il n'est pas souvent aisé d'établir des corrélations entre les données déduites de ces expériences avec les processus de transcription. Ces marquages ont dans un premier temps permis d'observer le profil de réplication et ségrégation des loci frères chez *D. dadantii*.

En effet, les gènes *fliT* et *ousA* sont distants de l'origine de réplication *oriC* et sont donc répliqués tardivement. Les loci frères correspondants se retrouvent proches du centre de la cellule dans l'axe longitudinal. Le gène *peIB* est plus proche de l'origine de réplication et sont donc répliqués avant *fliT* et *ousA*. Le gène *peIA* est à peu près à mi-distance de l'origine et du

terminus de réplication et présente un profil de réplication-ségrégation intermédiaire entre celui de *pelB* et ceux de *ousA/fliT*. Ces résultats suggèrent une position centrale de l'origine et du terminus de réplication dans la cellule avec les bras chromosomiques droit et gauche localisés dans les deux moitiés de cellules opposées. Cette orientation du chromosome dans la cellule nommée « Left-ori-Right » correspond à celle retrouvée chez la bactérie *Escherichia coli* (Nielsen et al., 2006). Selon ce modèle, la réplication bi-directionnelle est initiée au niveau de *oriC*, au centre de la cellule, les origines nouvellement répliquées migrent aux positions - 1/4 et 3/4 puis la ségrégation des loci frères se poursuit jusqu'au terminus (Figure 64). Il existe, notamment un autre type de configuration nommée « ori-ter » qu'on retrouve par exemple chez *Caulobacter crescentus*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Bacillus subtilis* (Badrinarayanan et al., 2015). Dans ce cas, l'origine et le terminus de réplication sont situés aux pôles opposés de la cellule et le chromosome est organisé longitudinalement (Lemon et al., 2001; Vallet-Gely and Boccard, 2013; Viollier et al., 2004), (figure 68).

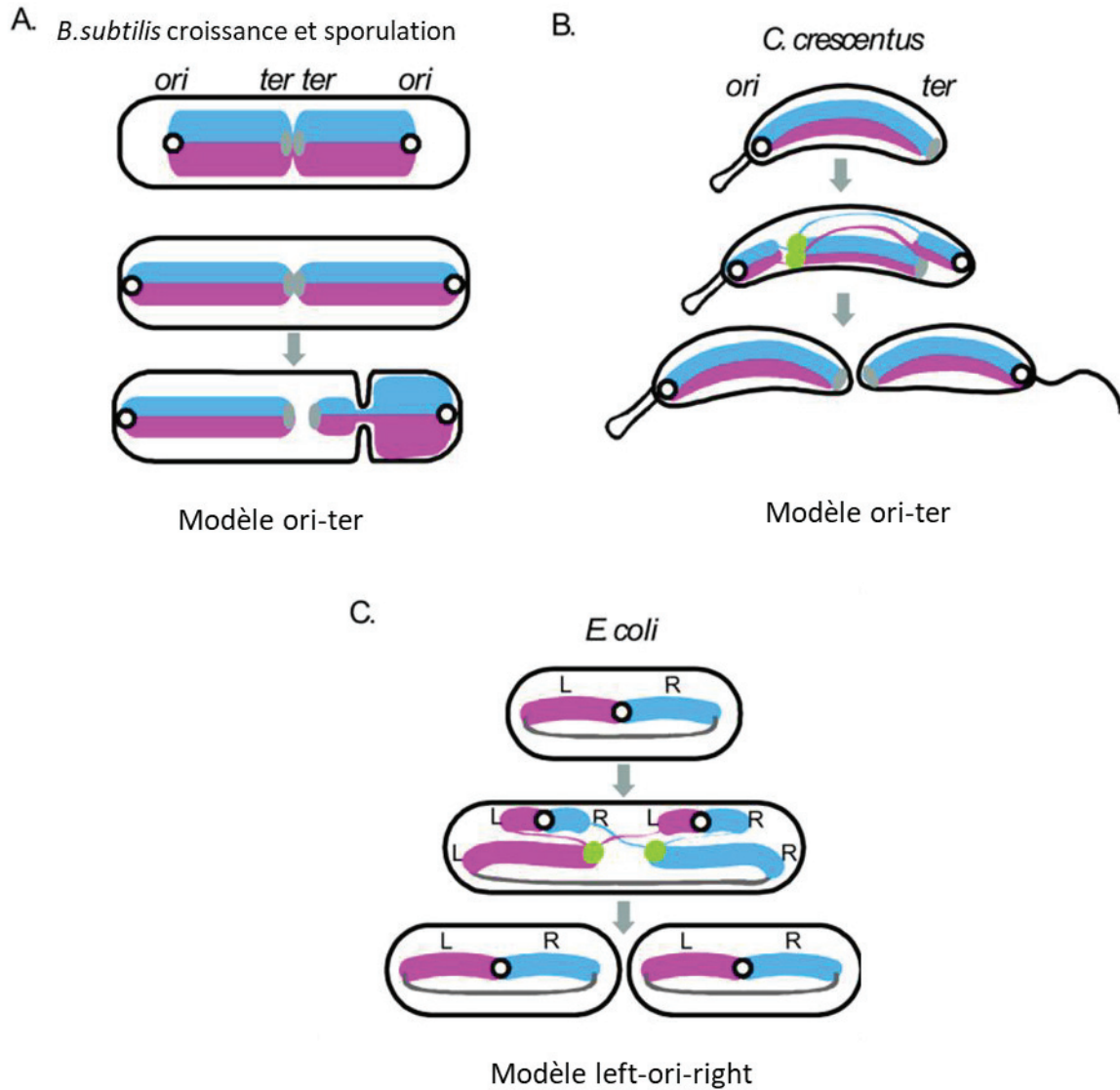


Figure 68 : Modèle de ségrégation des chromosomes (adapté de la source (Wang et al., 2013)). Chaque panneau représente le mode de ségrégation pour l'organisme cité : *Bacillus subtilis* (A), *Cauleobacter crescentus* (B), *Escherichia coli* (C). *B. subtilis* est capable de sporuler et présente comme *C. crescentus* un mode de répllication-ségrégation en « ori-ter » alors que *E. coli* présente un mode de répllication-ségrégation en « left-ori-right ».

Bien que les résultats préliminaires obtenus chez *D. dadantii*, laisse entrevoir des processus relativement similaires avec le modèle établi chez *E. coli*, il faudra confirmer que les étapes essentielles sont conservées. Il faudra notamment approfondir les résultats chez *D. dadantii* par le suivi des autres loci repartis sur les réplichoires droit (tel que *cbrB*) et gauche (tel que *sufA*, *proV* ou *envZ*) ainsi qu'au niveau de *oriC* et *ter* qui n'ont pas pu être observés durant cette thèse. Des loci supplémentaires devront également être marqués pour avoir une bonne résolution des processus de répllication et de ségrégation des loci frères chez *D.*

dadantii. En effet, les problèmes d'instabilité des plasmides portant la protéine ParB fluorescente, rencontré à partir de la fin de ma première année de ma thèse, nous ont contraint à nous concentrer sur l'objectif principal de ma thèse mentionné ci-dessus. Il faudra essayer de développer un système d'intégration de ParB -fluorescent dans le chromosome pour résoudre ces problèmes d'instabilité plasmidique. Le grand défi consistera à trouver un système plus inductible pour compenser le nombre de copie unique. Un des candidats est le système tetO/répresseur TetR inductible à l'anhydrotetracycline qui fonctionne bien chez *D. dadantii*.

La coordination de l'expression des gènes distribués sur différentes parties du chromosome et contrôlés par un même régulateur demeure encore relativement peu comprise. Dans une deuxième phase de notre étude, nous avons utilisé l'approche de la colocalisation, précédemment décrite pour suivre les loci frères ci-dessus, afin d'essayer d'apporter des réponses expérimentales aux analyses bio informatiques prédisant une colocalisation spatiale en 3D des différentes cibles de KdgR, répresseur principal des gènes impliqués dans le catabolisme de la pectine, de manière à optimiser leur co-régulation et la sécrétion des enzymes extracellulaires codés par une majorité de ces gènes (voir partie I introduction et contexte de l'étude, (Le Berre et al., 2022)). Les résultats obtenus en utilisant le couple *pelA/pelB*, codant deux des cinq pectate majeures, semblent indiquer l'absence d'une colocalisation de ces deux gènes dans des conditions standard de croissance durant la phase exponentielle. Notons que ces deux gènes sont localisés sur le réplichore gauche et distant de 863kb. Les conditions expérimentales utilisées correspondent à un état de répression des cibles de KdgR. Il faudra également reproduire ce genre d'expérience dans les conditions d'induction (présence de composés pectiques durant la phase stationnaire précoce). En effet, il se pourrait que les prédictions informatiques ne concernent que cette phase durant laquelle la forte production de pectinases nécessiterait une organisation particulière de leurs gènes de manière à optimiser le processus de sécrétion. Il faudra élargir ces analyses à d'autres couples de gènes co-régulés par KdgR localisés notamment sur des réplichores différents. Par ailleurs, les différents gènes *pels* présentent un grand nombre de régulation communes mais également des régulations spécifiques ; *pelA* est l'un des gènes dont la régulation présente le plus de spécificité (Lautier and Nasser, 2007; Reverchon and Nasser, 2013; Reverchon et al., 1997). Il faudra sélectionner des couples ayant un maximum

de régulateur en commun. Enfin, nous pourrions modifier la périodicité en insérant un ADN exogène entre deux cibles et apprécier ultérieurement l'impact de cette insertion sur la synchronisation de l'expression des gènes considérés et leurs éventuelles colocalisations.

Nous avons dans un troisième temps exploré la corrélation entre expression génique et localisation subcellulaire en suivant des loci localisés à proximité de gènes dont l'expression est modulée par des conditions environnementales (choc acide, stress osmotique et oxydant) rencontrées par *D. dadantii* durant la pathogénèse. Ainsi, pour les loci proches des gènes activés par ces conditions (*ousA* et *pggS* pour le stress osmotique, *asr* pour le choc acide et *kduI* pour le stress oxydant), il a été observé une relocalisation du centre vers la périphérie alors qu'une relocalisation de la périphérie vers le centre est constatée pour les loci insérés au voisinage des gènes réprimés (*fliT* en stress osmotique, *peIA* dans le cas des stress oxydant). De manière concordante, la stabilité d'expression de l'insertion au voisinage du gène *peIB* en réponse à l'ensemble des stress appliqués est corrélée à une localisation stable de ce locus au sein de la cellule. Ainsi bien qu'il n'y ait pas une corrélation stricte entre l'impact des conditions sur l'expression génique et l'intensité de la relocalisation, **nous établissons pour la première fois une corrélation entre l'expression génique et la localisation subcellulaire de loci en réponse à des variations des conditions environnementales.** Nos résultats corroborent ceux obtenus chez *E. coli* portant une fusion chromosomique *lacI*-GFP et délété des opérateurs lacO (figure 69). L'introduction dans cette souche d'un plasmide portant 5 opérateurs lacO mais pas de promoteur présente une fluorescence diffuse, démontrant une distribution aléatoire du plasmide dans le cytoplasme alors qu'un plasmide dérivé portant un promoteur constitutif est relocalisé à la surface du nucléoïde et aux pôles de la cellule. Ainsi la transcription à partir du promoteur cloné sur le plasmide entraîne une relocalisation dans la cellule pour favoriser l'expression génique (Sánchez-Romero et al., 2012). Toutefois, ces données ne concernent que des systèmes plasmidiques artificiels et il aurait été souhaitable que ces observations soient complétées par l'analyse de loci natifs du chromosome pour donner plus de poids à ces études.

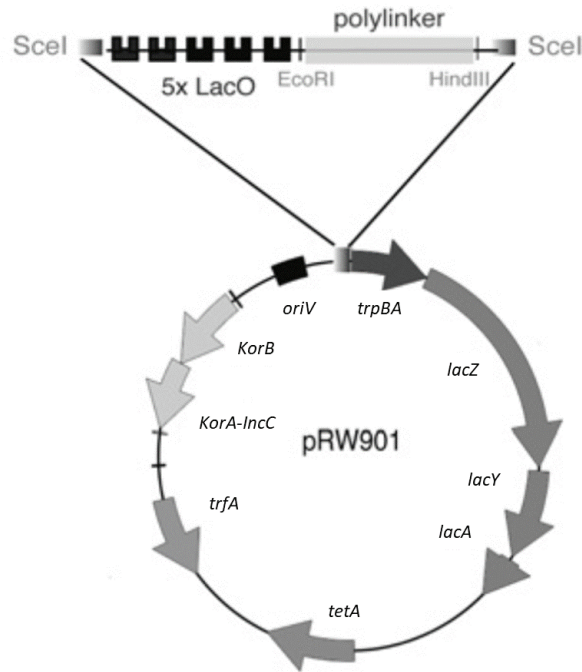


Figure 69 : Plasmide permettant l'observation des relocalisation en fonction de l'expression chez *E. coli* (adapté de la source (Sánchez-Romero et al., 2012)). Ce plasmide a été utilisé afin d'intrégée une fusion *lacI*-GFP et ainsi observé la localisation subcellulaire du locus marqué.

Enfin nos résultats confortent les précédentes observations obtenues chez *E. coli* et *Bacillus subtilis*, dans des conditions de forte croissance, à propos de la localisation des foci de transcription, essentiellement constitués par plusieurs molécules d'ARN polymérase fixées sur les opérons des ARN de ribosome. Le fait que ces foci soient principalement localisés à la périphérie du nucléoïde a conduit à avancer l'hypothèse d'une localisation similaire pour des gènes activement transcrits (Bremer et al., 2003; Jin and Cabrera, 2006; Jin et al., 2017; Stracy et al., 2015)

Il faudra toutefois étendre ces premières études à un plus grand nombre de loci de manière à s'assurer de la robustesse des résultats obtenus. L'extension de ces études pourrait également à terme permettre de valider expérimentalement la pertinence des domaines d'expression chromosomique identifiés chez *D. dadantii* (Bouyioukos et al., 2016; Jiang et al., 2015; Reverchon et al., 2021). Le rôle essentiel de ces domaines étant de permettre une expression cohérente et synchronisée de gènes impliqués dans des processus d'acclimatation, l'analyse de plusieurs loci au sein d'un même domaine devrait permettre d'en valider la pertinence.

Dans le cas particulier de *ahpC*, des spots de fluorescence ne sont observés qu'en présence du stress oxydant qui induit fortement l'expression de ce gène (plus de 1000 fois) ou en présence de rifampicine, connue pour décompacter le nucléoïde en raison de son action négative sur l'initiation de la transcription. Ces deux observations suggèrent que la structure du nucléoïde a un impact sur l'expression de *ahpC*. Il sera intéressant d'étendre ces analyses en présence de rifampicine aux autres loci étudiés. Il faudra également analyser l'impact de la novobiocine, un antibiotique connu pour relâcher l'ADN via une inhibition de la gyrase, sur la dynamique des loci considérés. L'expression de la majorité des gènes ciblés dans cette étude étant modulée par la novobiocine (figure 70).

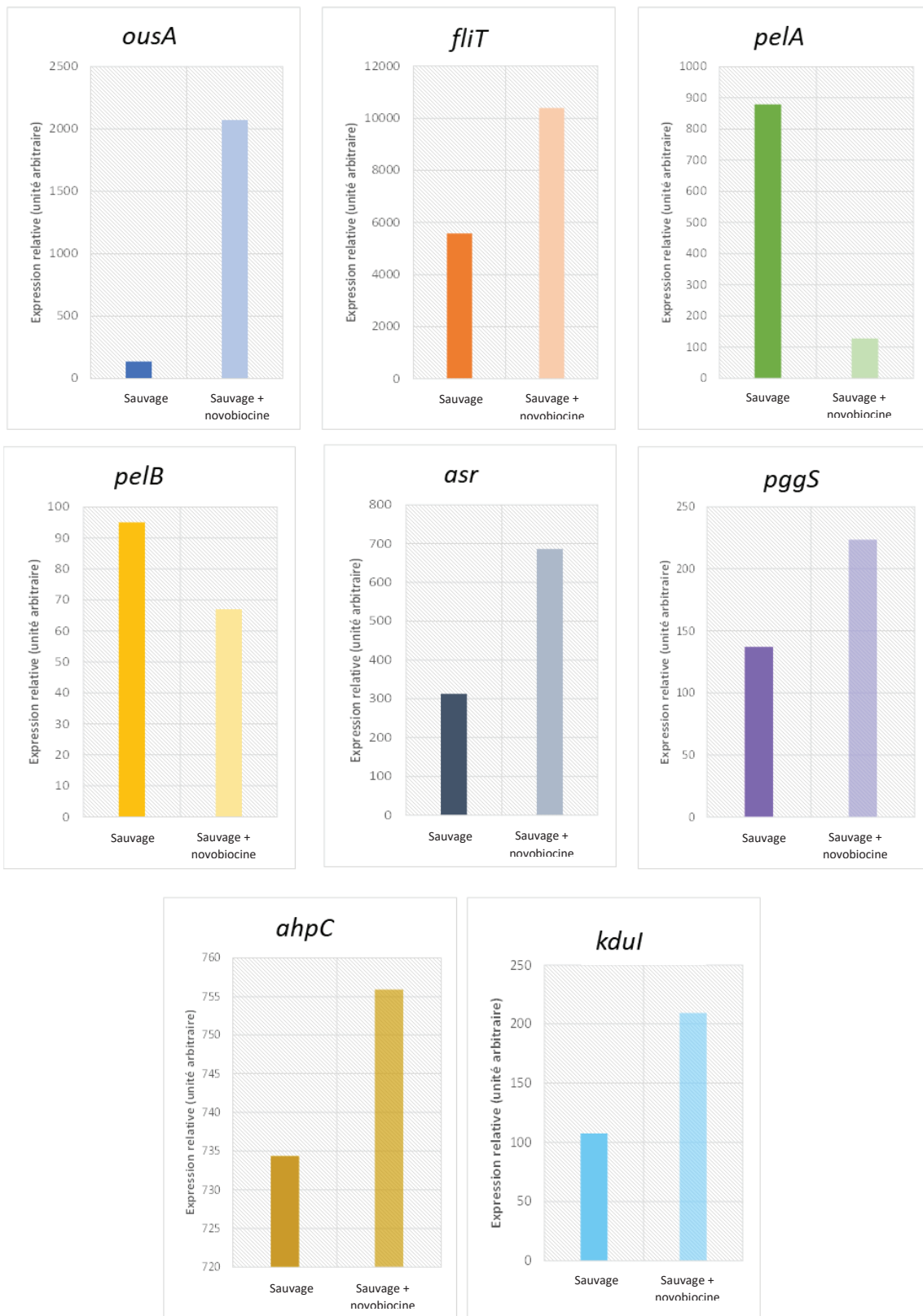


Figure 70 : Expression relative des gènes possédant des insertions *parS* en présence de novobiocine. Ces expressions sont issues de puces à ADN, on observe une augmentation de l'expression des gènes en présence de novobiocine sauf pour les deux gènes *pelA* et *pelB* codant pour des pectinases dont l'expression diminue en présence de novobiocine.

Enfin, comme précédemment indiqué, trois des cinq NAPs majeures (H-NS, FIS et IHF) sont impliquées dans la coordination de la synthèse des fonctions de virulence de *D. dadantii* y compris les acteurs codés par les gènes ciblés dans cette étude (figure 71). Il sera intéressant d'étendre ces études, comme initialement postulé, à ces trois NAPs de manière à voir si elles sont impliquées dans les processus de relocalisation observés. En préalable à ces investigations, tous les loci marqués dans le cadre de ce travail ont déjà été transduits dans les mutants *hns*, *fis* et *ihf*. Ainsi de nouvelles informations concernant la dynamique du nucléoïde et l'expression génique bactérienne en relation notamment avec des processus d'acclimatation rapides seront générées.

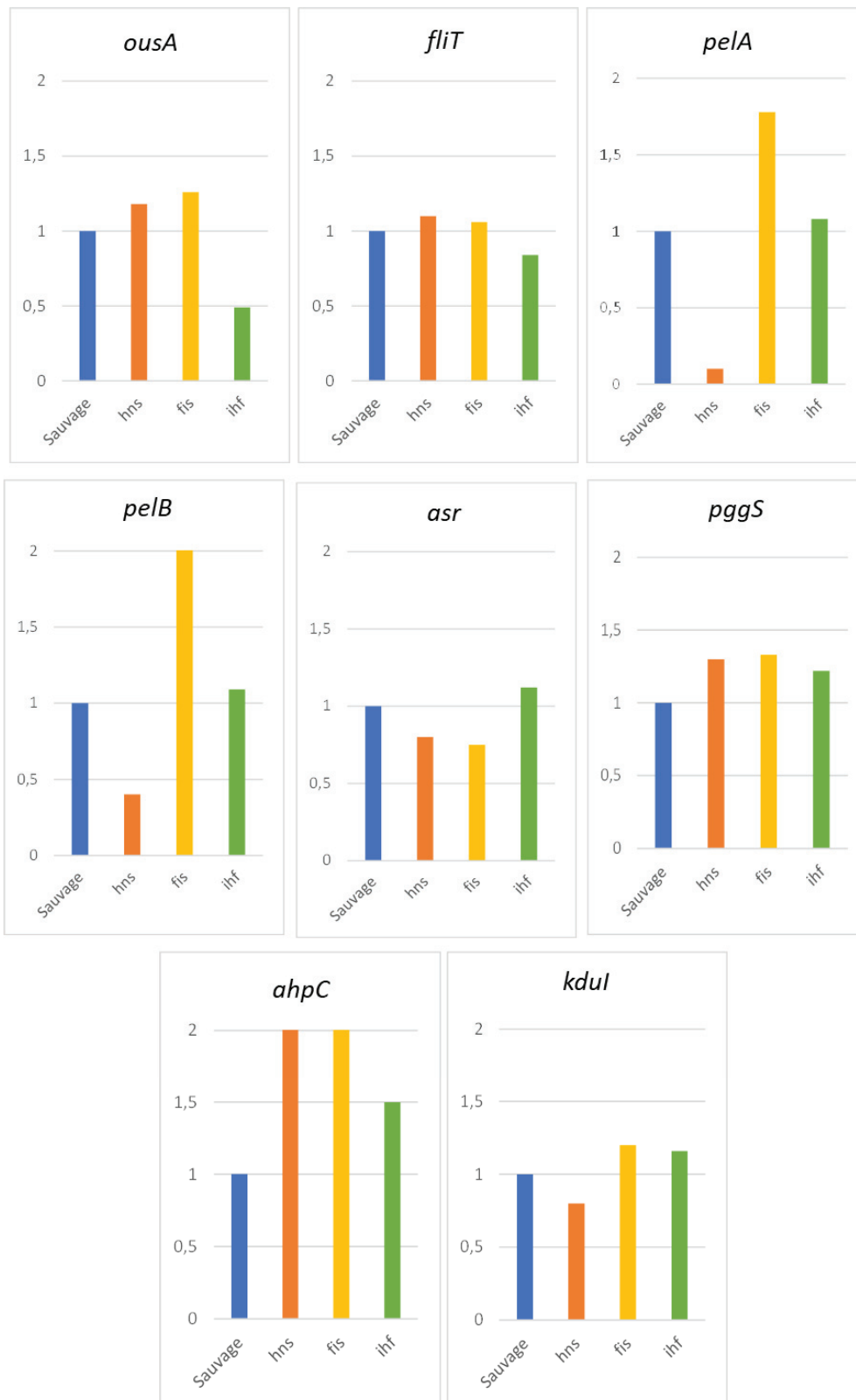


Figure 71 : Expression relative des loci marqués dans les mutants NAPs. Les graphiques représentent le niveau d'expression des loci d'intérêt dans les différents mutant NAPs par rapport à la souche sauvage (valeur normalisée à 1). Ces données ont été récoltées sur des cellules en phase exponentielle de croissance, où l'impact des NAPs sur les gènes notamment des gènes *pels* est plus importante car l'expression des gènes est requis.

Partie V : Annexes



Review

Relationship between the Chromosome Structural Dynamics and Gene Expression—A Chicken and Egg Dilemma?

Diana Le Berre ¹, Sylvie Reverchon ¹, Georgi Muskhelishvili ² and William Nasser ^{1,*}



Citation: Le Berre, D.; Reverchon, S.; Muskhelishvili, G.; Nasser, W. Relationship between the Chromosome Structural Dynamics and Gene Expression—A Chicken and Egg Dilemma? *Microorganisms*

2022, 10, 846. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10050846>

Academic Editor: Anders Løbner-Olesen

Received: 4 April 2022
Accepted: 14 April 2022
Published: 20 April 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article

distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

¹ Université de Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1, INSA-Lyon, CNRS, UMR5240 MAP, CEDEX, F-69622 Villeurbanne, France; diana.le-berre@etu.univ-lyon1.fr (D.L.B.); sylvie.reverchon-pescheux@insa-lyon.fr (S.R.)

² School of Natural Sciences, Agricultural University of Georgia, 0159 Tbilisi, Georgia; g.muskhelishvili@icloud.com

* Correspondence: william.nasser@insa-lyon.fr; Tel.: +33-472-438-568

Abstract: Prokaryotic transcription was extensively studied over the last half-century. A great deal of data has been accumulated regarding the control of gene expression by transcription factors regulating their target genes by binding at specific DNA sites. However, there is a significant gap between the mechanistic description of transcriptional control obtained from in vitro biochemical studies and the complexity of transcriptional regulation in the context of the living cell. Indeed, recent studies provide ample evidence for additional levels of complexity pertaining to the regulation of transcription in vivo, such as, for example, the role of the subcellular localization and spatial organization of different molecular components involved in the transcriptional control and, especially, the role of chromosome configurational dynamics. The question as to how the chromosome is dynamically reorganized under the changing environmental conditions and how this reorganization is related to gene expression is still far from being clear. In this article, we focus on the relationships between the chromosome structural dynamics and modulation of gene expression during bacterial adaptation. We argue that spatial organization of the bacterial chromosome is of central importance in the adaptation of gene expression to changing environmental conditions and vice versa, that gene expression affects chromosome dynamics.

Keywords: bacteria; genetic regulation; transcription; DNA supercoiling; chromosome dynamics; chromosomal expression domains; nucleoid-associated proteins

1. Introduction

The organization of the bacterial nucleoid structure is a compromise between the requirements of the dramatic (about thousand-fold) compaction of DNA and the accessibility of the genetic material to enzymes securing vital functions such as replication, transcription and repair. Recent studies demonstrate that bacterial chromosomes are not only highly compacted but also spatially organized, with distinct genetic loci occupying specific positions in the cell [1–4]. In parallel with this organizational feature, the order of genes along the chromosomal replication origin to the terminus (OriC-Ter) axis was found to be highly conserved in bacteria [5]. This gene order appears to be highly relevant since recent observations suggest the limited diffusion of mRNAs from their site of production and the close physical coupling of translation to the site of transcription in the nucleoid [6,7]. In *Escherichia coli*, it is shown that chromosome compaction varies during the growth cycle. For example, during rapid exponential growth characterized by high levels of negative superhelicity, the chromosome is condensed with RNA polymerase (RNAP) mainly accumulated at a few highly active loci such as those encoding ribosomal RNA [8]; by contrast, at the entry in the stationary phase of growth associated with DNA relaxation, the chromosome decondenses demonstrating a uniform distribution of RNAP molecules

over its entire surface (Figure 1). There is ample evidence that the different levels of chromosomal DNA organization play a role in transcriptional regulation and that conversely, transcription affects chromosome organization [9–12]. The relationship between chromosomal DNA supercoiling and transcription is aptly defined as a “two-way street” [13] which essentially poses a chicken and egg dilemma. Configurational changes of the chromosome (or particular chromosomal regions) appear to reveal an effective adaptation strategy for producing rapid coordinated genetic responses to adverse conditions [1,14]. Accordingly, the organization of nucleoid structure is hierarchical and dynamic due to the input of various factors, including transcription, molecular crowding, DNA supercoiling and the binding effects of nucleoid-associated proteins (NAPs) [4,9,15,16]. Of these factors, NAPs and transcription-generated supercoiling gained substantial attention during recent years.

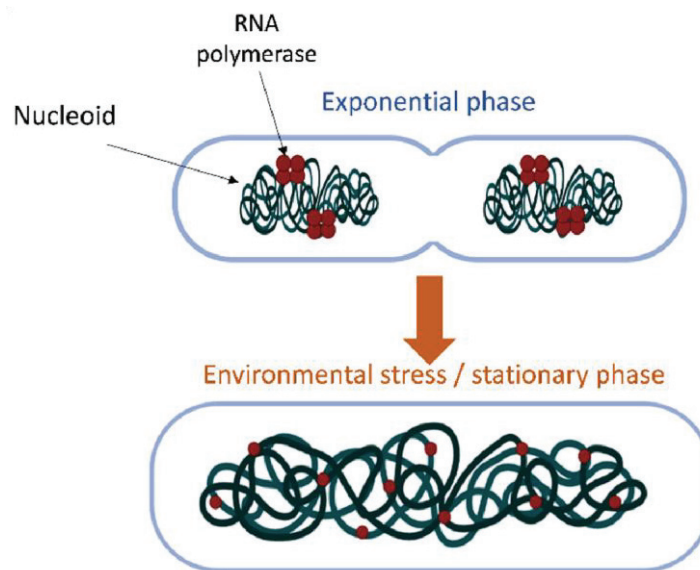


Figure 1. Localization of RNA polymerase (red) and cellular space occupied by the nucleoid (green) during rapid exponential growth and early stationary growth or stress conditions.

2. NAPs Are Versatile and Flexible Actors in Coupling Nucleoid Organization and

Transcription Request

Chief among the bacterial global regulators are the abundant NAPs, which are thought to influence both the chromatin structure and transcription [1,15,17,18]. Various studies using both ensemble and single-molecule experiments revealed that the binding of NAPs could result in the bending, bridging, wrapping and clustering of DNA [9,15]. Most NAPs bind DNA with relatively low specificity and form higher-order nucleoprotein complexes; notably, NAP binding sites are generally AT-rich, which is a characteristic feature of gene promoters. By virtue of their ability to constrain DNA supercoils, NAPs both facilitate the compaction of the bacterial chromosome and also exert long-range regulatory effects on genomic transcription [1,17,19], whereas transcription factors with more local effects essentially act upon the structural constraints imposed by NAPs. Both the abundance and the composition of NAPs as well as the global superhelical density of DNA, change with the growth phase [20,21]. Dynamic changes in chromosomal supercoil density during the bacterial growth cycle reflect the crosstalk between the NAPs and the DNA

topoisomerases, which in turn depends on the metabolic state of the cell [22,23]. This crosstalk appears determinative for the growth phase-dependent pattern of gene expression [19]. Moreover, global supercoiling can also change instantly under the influence of environmental factors, optimizing the genomic transcriptional response to challenges [24,25]. This optimization involves the cooperative binding effects of various NAPs stabilizing distinct supercoil structures and interactions favoring the expression of relevant genes [1,14,26,27]. For example, both in the human pathogenic bacteria, *Salmonella enterica*, and in the plant pathogenic bacteria, *Dickeya dadantii*, cooperative effects of NAPs and DNA supercoiling coordinate the expression of virulence and adaptive genes required at different stages of pathogenic growth [28–31]. Notably, recent phylogenetic studies revealed that NAPs are highly conserved within bacterial families, some of them being conserved among all prokaryotic species [4,15] while all bacterial species encode at least one NAP [16], suggesting a selective advantage of NAP-dependent nucleoid structuring.

NAPs thus play a crucial role in the adaptation of bacteria to unfavorable conditions and environmental stress [14,32–34]. Historically, in Gram-negative bacteria, the majority of studies on NAPs were performed in the model bacterium *Escherichia coli* and focused on the five major proteins H-NS, FIS, IHF, Lrp and HU, for which a direct role in transcriptional regulation was clearly established [15] and is briefly characterized below (Figure 2).

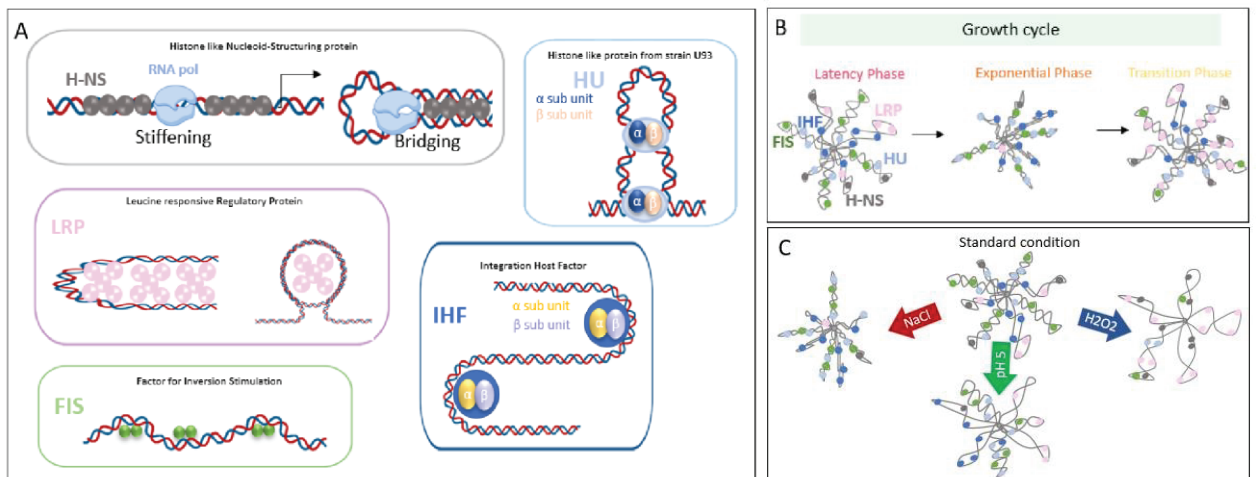


Figure 2. (A) Structural impact of the main Nucleoid-Associated Proteins (NAP) in DNA. (B,C) Changes in chromosomal compaction level and bound NAPs during growth (B) and under various environmental conditions (C).

2.1. H-NS

H-NS (histone-like nucleoid-structuring protein) is considered a global modulator of

genes involved in adaptive processes related to changes in environmental conditions. DNA binding by H-NS is sensitive to environmental factors and DNA supercoiling states [1,15,30,35]. It binds cooperatively to AT-rich sequences to silence transcription [36,37]. Accordingly, H-NS controls virulence functions in a variety of animal and plant pathogens [30,38–42]. How H-NS represses gene transcription remains controversial. For some genes, H-NS is likely to occlude RNA polymerase binding, while for others, it represses transcription by binding downstream of the promoter [43]. Single-molecule experiments provide insights into how H-NS regulates gene expression by condensing the DNA. Atomic Force Microscopy (AFM) imaging reveals that H-NS can bridge adjacent DNA segments

or form compact DNA-protein foci. The loops trapped by H-NS could, in some cases, prevent the binding of RNA polymerase or stall its translocation, while in some other cases, they trap the RNA polymerase open complex [43]. Further studies showed that H-NS could also extend DNA by polymerizing along the double helix in a Mg^{2+} concentration-dependent manner: above 5 mM Mg^{2+} , the extension mode is inhibited, and instead, H-NS switches to bridging the DNA duplexes. It remains unclear whether H-NS primarily bridges or extends the DNA in vivo or whether these binding modes are mutually exclusive [43]. A more recent study revealed that H-NS-mediated environmental sensing operates mainly through its dimerization site2 located, as well as the dimerization site1, in the N-terminal domain of the protein [35,44]. The combination of site1 and site2 allows H-NS to multimerize and stably coat DNA with resultant gene silencing, whereas the unfolding of site2 at elevated temperature, high salinity or acidic pH results in an autoinhibited conformation incapable of stably interacting with DNA [35,45].

Interestingly, variations in the site2 sequence alter the sensing sensitivity of H-NS orthologs to fit different bacterial lifestyles [35].

2.2. FIS

FIS (factor for inversion stimulation) is a NAP initially characterized as a stimulator

of site-specific DNA recombination. FIS activates genes and operons involved in primary metabolism, including those encoding biosynthetic enzymes and stable RNAs [46]. FIS is also required for *oriC*-directed DNA replication and modulates the DNA supercoiling state by repressing DNA gyrase and stimulating topoisomerase I gene expression [47,48]. FIS can also influence DNA topology directly by binding to DNA and constraining supercoils. In particular, it acts as a buffer preserving intermediately supercoiled forms of DNA and precluding extreme shifts towards the more relaxed or more negatively supercoiled ends of the topological spectrum [49]. FIS is thus considered to act as a local topological homeostat [23]. The cellular concentration of FIS is subject to complex and multifactorial regulation. FIS is strongly produced during the exponential phase of cells grown in a rich medium and becomes nearly undetectable before the cells enter the stationary phase [50]. One important function of FIS is to shut off the expression of nonessential genes during rapid growth [51]. Furthermore, FIS is implicated in the regulation of virulence functions in pathogenic strains of *E. coli* [52], *Shigella flexneri* [53], *Salmonella* [54,55], *Vibrio cholera* [56] and *D. dadantii* [57].

2.3. IHF

IHF (integration host factor) is a heterodimeric protein composed of IHF α and IHF β subunits, respectively, encoded by *ihfA* and *ihfB* genes. Upon binding, IHF bend DNA by as much as 180 °C and thus promote long-range interactions. The influence of IHF on local DNA structure is critical for its contribution to transcriptional regulation [31]. In some cases, the DNA-bending activity of IHF is shown to enhance the formation of open complexes by facilitating the transmission of DNA twist from upstream AT-rich DNA regions to the promoter [58]. IHF also affects chromosomal replication initiation and DNA transposition. Therefore, IHF plays a role in both nucleoid structuring and DNA rearrangement. In addition, IHF is identified as a regulator of virulence functions in various pathogenic bacteria, including *Brucella abortus*, *Shigella flexneri*, *Salmonella*

enterica, enteropathogenic and enterohemorrhagic *E. coli*, *V. cholerae* and *D. dadantii* [31,59,60].

2.4. HU

HU (histone-like protein from strain U93) is found as a homo- or heterodimer of the homologous subunits α and β . HU has a preference for binding distorted regions of the DNA, such as kinks or four-way junctions [15]. In vitro HU facilitates toroidal coiling of the DNA, which is apparently antagonized by H-NS [26]. HU can contribute to nucleoid compaction by bending or wrapping DNA [61]. Transcriptome studies revealed a role in the supercoil-constraining capacity of HU in gene regulation [62]. Furthermore, HU is proposed to modulate the gradient of DNA superhelical density and strength of transcription along the OriC-Ter axis of the chromosome [63]. HU modulates the expression of a large number of genes in *E. coli*, including those involved in primary metabolism and respiration [15]. HU also coordinates the virulence function and the stress response in *S. enterica* [34]. Recent findings implicate HU in remodelling the nucleoid architecture during bacterial growth and synchronizing the genetic responses mediated by variable constraints of DNA superhelicity under changing environmental conditions [61].

2.5. LRP

Lrp (leucine-responsive regulatory protein) regulates the expression of more than 10%

of the *E. coli* genome [15,64,65]; its activity can be modulated or left unaffected by leucine depending on the function of the target genes. The Lrp regulon includes genes involved in nutrient uptake and amino acid metabolism. Lrp is thought to mediate “feast and famine” transitions because of its opposite regulation of amino acid metabolism: activation of anabolic genes and repression of catabolic genes. Lrp also modulates bacterial virulence, regulating genes involved in the phase-variable expression of pili and nonfimbrial adhesin in *E. coli* and *Salmonella* [66,67] as well as LEE genes of *Citrobacter rodentium* [68]. It has a profound impact on the trajectory of the bound DNA. By wrapping DNA, Lrp can stabilize positive supercoils [15].

Thus, essentially, NAPs appear to coordinate metabolic demand and genomic expression (including the virulence ‘program’) in adaptation to the changing growth environment. However, NAPs are also involved in maintaining supercoiling homeostasis by modulating the activity of topoisomerases both via direct effects on their substrate topology (i.e., variable constraint of DNA supercoils) and indirectly by regulating topoisomerase gene expression.

3. Transcription, a Global Regulator of DNA Supercoiling State and Local Organization of the Nucleoid

Transcription is a complex multifactorial process in which the central player is RNA polymerase. The interconnections between the chromosome structural organization and RNA polymerase activity have been extensively reviewed [9,12,69–71]. It is long known that RNAP activity is modulated by sigma factors, NAPs, transcription factors and the structure of gene promoters [69]. Different RNAP holoenzymes demonstrate different preferences for supercoiling the template DNA [72]. However, the process of transcription itself significantly affects DNA topology by inducing positive supercoiling immediately downstream and negative supercoiling upstream of the translocating RNAP [73] (Figure 3).

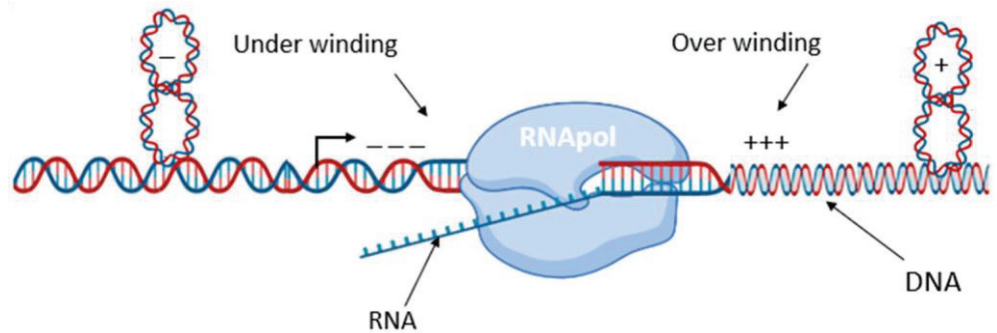


Figure 3. The twin supercoiling domain model. Transcription induces positive DNA supercoils downstream of RNA polymerase and negative DNA supercoils upstream. Diffusion of negative supercoiling behind RNA polymerase aids DNA melting and thus increases transcription initiation and inhibits termination, while diffusion of positive supercoiling in front of RNA polymerase inhibits initiation and increases termination.

These transient changes in supercoiling can lead to supercoil diffusion modulating the activity of neighboring gene promoters [74]. Recent advances in high-throughput approaches and novel experimental technologies combined with bioinformatics tools provided a breakthrough in the field of transcriptional regulation. First, the studies revealed widespread antisense transcription in the genome [75]. Such antisense transcription resulted partially from the capacity of RNAP to remain bound to DNA following intrinsic termination and to restart transcription in the reverse direction [76]. Second, the relative spatial organization of the transcription units was implicated in gene regulation by relaying the DNA supercoil dynamics induced by translocating transcription machinery to neighbor genes over distances of ≥ 10 kb, substantially exceeding the size of individual operons [10,77,78]. Third, genomic spatial transcript patterns were observed that could not be explained on the basis of transcription factor–target gene interactions [78–81]. These findings underscored the importance of genetic control based on spatial considerations and, thus, ultimately, on the configuration of the chromosome.

On the other hand, compelling data was obtained concerning the dynamic organization of the bacterial chromosome. The positioning of the chromosome in growing cells was shown to follow a predetermined choreography. Furthermore, various dynamic organizational features of the *E. coli* chromosome structure pertinent to transcription were observed, including the *rrn* functional domain spanning the chromosomal Ori end, large clusters of genes sensitive to “nucleoid-perturbation”, DNA supercoiling-dependent spatial transcript patterns spanning regions from 16 to 800 kb in size, 10–20 kb topological domains and 5–10 kb gene proximity clusters [63,79,80,82,83]. Nevertheless, to date, chromosomal dynamics are mainly analyzed with respect to the processes of DNA replication and chromosome segregation [84–86], whereas the crosstalk between chromosome configuration and gene expression remains largely unknown. Here, we expand on this topic, with a focus on the coordination of bacterial gene regulation and chromosome dynamics.

4. Chromosomal Organization of an “Archipelago” of Functionally Related Genes

Facilitates Coordinated Gene Transcription

In order to reduce the energy spent on gene regulation and orchestrate the production of numerous factors involved in a metabolic pathway or adaptation to a particular challenge, bacteria have set up different synchronization tools and processes. For a long time, studies focused on genetic processes that

elucidated the synchronization of genetic expression based on operon structures or the organization of genes in spatial proximity to each other (synteny). In contrast, the coordinated expression of regulons and, in general, coordinated expression of gene clustered at different places in the genome ('archipelago' organization) has long remained a mystery, confounded further by the emergence in the 2000s of data indicating a relatively slow diffusion of regulatory proteins from their sites of production in the cell. Consequently, epigenetic-type mechanisms linked in particular to the structural dynamics and organization of the chromosome previously observed in eukaryotes were then explored. Hence, the implementation of tools to assess the long-range patterns on a genome-wide scale prompted the study of co-regulated, isofunctional and evolutionary correlated gene sets [87–90]. The implementation of these tools enabled the proposal of models for the co-regulation of genes, especially those involved in secondary metabolism or virulence, scattered in the bacterial genome (Figure 4).

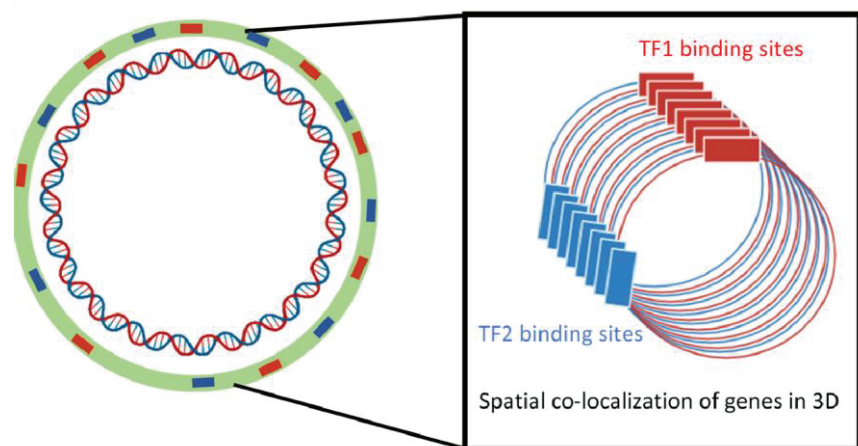


Figure 4. Spatial organization of genes scattered along the genome can result in archipelagos of co-expressed genes.

However, the most successful model concerns the genes for pectinolysis in bacterial genera *Dickeya* and *Pectobacterium*, responsible for soft rot disease in a wide range of plants. In these bacteria, the major virulence factors are pectate lyases, secreted by a specific type II secretion system [91,92]. The genes encoding pectate lyases, the secretion system, and all the other cellular proteins involved in pectin catabolism are co-regulated by the KdgR transcription factor, which is responsible for their induction in the presence of pectin [93,94].

All these co-regulated genes are scattered in multiple islands in the genome, raising the question of the control of the timing of their synthesis and translocation. By using the so-called algorithm “patterns”, allowing the identification of the periodicity of gene location on the chromosome [87], found that KdgR targets are distributed periodically, being organized in a single “archipelago” on a genome-wide scale. Furthermore, the analyses revealed that the genes encoding secreted pectinases are expressed from the same DNA strand. Such organization is supposed to favor the funneling of newly synthesized pectinases toward a convergent point in the cell, optimizing their coordinated secretion via the type II secretion system. However, these bioinformatics analyses need to be validated experimentally, which can be conducted, e.g., by positionally shifting the *kdgR* gene in the chromosome, or by disrupting the periodic spatial distribution of the KdgR regulon by introducing DNA ‘spacers’ between the regulated genes (Figure 4).

Chromosomal position shifts of regulatory genes are instrumental in gaining insights into spatial aspects of gene regulation. For example, the data obtained in *E. coli* revealed that the regulation of gene expression by the major NAP H-NS depends on the chromosomal position of the target promoters, indicating that genomic position can play a significant role in the adaptation of the cells to environmental changes [4,95]. Similar experiments using a positional shift of the *fis* gene encoding the NAP FIS demonstrated that spatial separation between regulator and target genes could influence their interaction and, ultimately, the bacterial phenotype [96]. Such spatial effects are consistent with the proposal that the physical structure of the chromosome is optimized by direct regulatory interactions involving the NAPs and other DNA structuring proteins [97,98]. Indeed, a comparison of the NAP effects on the frequency of DNA–DNA (Hi-C) interactions in *E. coli* [99] revealed that the various NAPs contribute to nucleoid organization by promoting or restricting long and short-range contacts on a genome-wide scale. Recently [100], combined the study of gene expression and spatial organization (RNA-seq and Hi-C) of the genome with the computational analysis of the impact of chromosome spatial organization on gene expression in *E. coli*. They observed recurrent sinusoidal patterns with region-dependent frequencies and high co-expression proportional with spatial proximity (Figure 4). Computational data analysis and simulation, including the search of connection to specific binding profiles of various regulators, led the authors to postulate local effects of nucleoid structure in synchronizing gene expression. These synchronizing effects occur through transcriptional spilling onto neighboring genes by sharing the local pools of RNA polymerase. The proposed mechanism is thus intrinsically dependent on the cooperation between the three-dimensional organization of the nucleoid and local availability of RNA polymerase. However, the approach used by the authors did not allow the evaluation of the possible indirect effects of the tested regulators. This model would benefit from performing expression experiments simultaneously in the parental *E. coli* strain and in the strains inactivated for the relevant regulators. Similarly, experiments aimed at testing the effects of disrupting the spatial proximity of co-expressed genes would be useful to support the proposed model.

5. Impact of Genomic Sequence Organization and Physical Locations of Genes on Transcription

Recent high-throughput studies mostly performed in *E. coli* and related bacteria discovered coherent transcript patterns spanning chromosomal regions from several kilobases to several hundred kilobases in size. Various factors are implicated in delimiting these regions of coherent gene expression, including strong transcription units [101–103], regulatory interactions [97], binding of NAPs and other DNA structuring proteins, including SMC proteins and macrodomain-specific proteins [99,104,105], DNA topoisomerases [4,71] and peculiar sequence organization [5,106,107]. We note that at the shortest length scales, the nucleoid is shown to be organized into supercoiled domains (SD) of ~10 kb in size that are topologically insulated from each other, and their existence is further supported by electron microscopy [83]. At a larger scale, Chromosome Conformation Capture (3C) and associated technologies (such as 3C-genomic and Hi-C approaches) revealed the existence of Chromosomal Interaction Domains (CIDs) as regions displaying high interaction frequencies [108]. A proportional relationship between the transcription level of genes and their contact frequencies was recently proposed in *E. coli* [99], implying that highly transcribed genes are organized spatially such that they interact more often. CIDs were reported for *Caulobacter crescentus*, *Bacillus subtilis* and

Mycobacterium pneumoniae. They range in size from 30 to 400 kb and exhibit significant variability in boundary sharpness, indicating that different cells might have different, perhaps transient, domain borders. The genomic DNA within each CID seems to be organized into supercoiled plectonemic loops of at least 10-kb in size. Boundaries between the CIDs are frequently created by long and strongly transcribed genes, although not all highly transcribed genes are associated with boundaries [109]. In *C. crescentus*, it was shown that active transcription blocks supercoil diffusion but that not all supercoil diffusion barriers are CID boundaries [110]. Thus the molecular mechanisms for boundary formation remain unclear. The current model proposes that transcription drives the local decompaction of chromosomal DNA, lowering the contacts between neighboring regions and thereby forming domain boundaries [111]. This assumption is supported by the fact that the inhibition of transcription by rifampicin causes a dramatic loss of the CID boundaries [99,112,113]. Additionally, in *Mycoplasma*, a bacterium with a reduced genome, the chromosome appears to be organized in domains of 15–33 kb in size and the genes within the same domain tend to be coregulated, suggesting that chromosome organization influences transcriptional regulation [113]. However, no direct evidence supporting this hypothesis is provided and the causal relationships between the observed correlations are not elucidated (Figure 5).

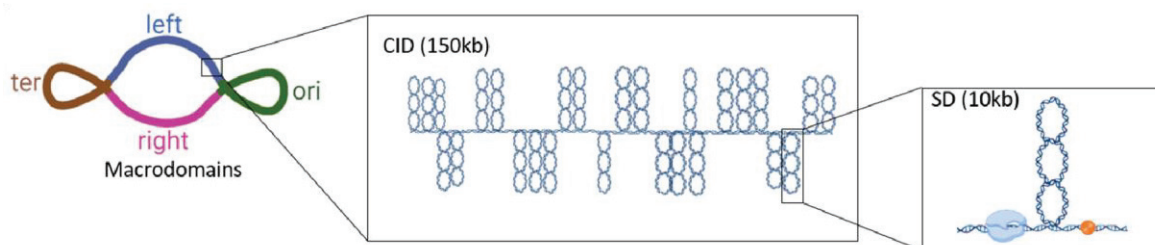


Figure 5. *Escherichia coli* chromosome organization. The chromosome is organized into 4 macrodomains with greater internal interactions: origin of replication, terminus of replication, the right and the left macrodomains. These macrodomains include more highly interacting chromosomal interaction domains (CIDs) and topologically isolated supercoiled domains (SDs).

Recent studies of the higher-order architecture of the *E. coli* and *B. subtilis* genomes highlighted the role of NAPs in determining the chromosome configuration [99,114]. In *E. coli*, HU and FIS promote long-range chromosomal contacts, whereas H-NS restricts short-range interactions. However, the underlying mechanisms utilized by these NAPs remain unknown. The abundant NAPs can either constrain supercoiling within CIDs or SDs to relieve torsional stress and stabilize domains or create complexes bridging the domains, thereby forming a larger CID with nested SDs [9]. Interestingly, in *B. subtilis* it was recently reported that the H-NS-like DNA binding protein Rok forms large nucleoprotein complexes that robustly interact with each other over large distances forming anchored chromosomal loops. These spatially isolated large sections of DNA resemble those generated by insulator proteins in eukaryotes. Although the formation of these DNA loops has an impact on the dynamics of the CIDs, their significance remains to be elucidated [114]. Furthermore, as observed for H-NS in *E. coli*, Rok restricts short-range interactions consistent with its silencing function of gene expression, as short-range chromosome interactions often correlate with gene expression in bacteria [99].

On a larger scale, chromosomes are organized into several macrodomains (around 1 MB each), first documented in *E. coli* [115,116]. These domains are: the origin (Ori), Right, terminus (Ter) and Left macrodomains, as well as two

additional non-structured domains, named the non-structured right (NSR) and left (NSL) domains that are, respectively, located between the Ori and the Right and Left macrodomains. Macrodomains were also identified in *B. subtilis* [112] but not in *Caulobacter* [117]. The macrodomains seem to be differentially regulated [5] and play functional roles in various DNA-related transactions such as replication and transcription [109]. Their properties seem to depend in part on active transcription, especially during the exponential growth phase [118]. Overall, it appears that both transcription and chromatin architecture influence domain formation, but the connection between the macrodomains, the CIDs with nested SDs and the process of transcription remains to be elucidated. It is necessary to explore additional bacterial models in various experimental conditions by evaluating, for example, the impact of factors implicated in the chromosome structuring under conditions of variable (high and low) transcription activity.

Recent studies highlighted the importance of the transcription-coupled diffusion of supercoils (TCDS) and the formation of the so-called coherent domains of transcription (CODOs) spanning chromosomal regions from several tens to hundreds of kilobases and encoding particular traits [71,107]. The features of the CODOs resemble those of the wellknown pathogenicity islands in which the grouped genes seem to be activated or repressed depending on the spatial pattern of organization, supercoil diffusion and regional structural dynamics, which directly correlate with DNA sequence organization. The CODOs were identified based on the physical properties of the expressed gene sequences, such as their dynamical behavior (supercoiling response), thermodynamic stability (average negative melting energy) and spatial orientation (leading/lagging strand bias). These domains of coherent transcription were particularly studied in the model commensal bacterium *E. coli* and the plant pathogenic bacterium *D. dadantii*. It was found that in *E. coli*, the genomic sequence organization favors a temporally sequential expression of genes required for growth along the OriC-Ter axis. Thus, the CODOs comprising relatively G/C rich genes required for rapid growth under conditions of high levels of negative DNA supercoiling are located in the vicinity of the origin, whereas those CODOs comprising relatively A/T rich genes less dependent on negative DNA supercoiling and required under conditions less favorable for growth are located closer to the terminus. In *Dickeya*, a more nuanced sequence organization of the genome is observed, demonstrating CODOs comprising genes coherently responding to different kinds of stress encountered during the infection process. It turned out that in *D. dadantii* various constellations of CODOs form transiently in response to particular environmental stress, whereby the CODOs demonstrate unique couplings between the dynamical and physicochemical properties of the expressed sequences, their functional content and the specific impacts of H-NS, FIS and IHF. Interestingly, while the mechanistic role of H-NS and FIS in the establishment of CODOs in *D. dadantii* remains unspecified, the establishment of CODOs by IHF was associated with the DNA supercoiling-dependent modulation of the directionality of transcription selecting the particular orientation of the transcribed genes [31]. Notably, inactivation of any of these three NAPs resulted in a reorganization of the genomic expression, thus attenuating bacterial pathogenicity by affecting many virulence genes required during the infection process [31].

Importantly, the targeted insertions of the *E. coli* *fisP*-YFP reporter construct in different CODOs in *D. dadantii* demonstrated that under various growth conditions, the reporter construct behavior reflected that of the targeted CODOs [107]. These observations suggested that CODOs are able to synchronize the expression of the inserted xenogenic promoter with the

expression of functionally linked genes (including the virulence genes) comprised in the CODO [71,107]. The hypothesis that the DNA context has an impact on reporter gene transcription was subsequently supported by a study using high-density insertions of reporter genes at different locations in the *E. coli* chromosome. The quantification of reporter activities revealed a 20-fold variation in transcriptional propensity across the genome leading the authors to propose that this bacterium possesses reporter gene-independent mechanisms for regulating expression from specific chromosomal regions [119].

6. Possible Impact of Transcription on Subcellular Localization of Genes

As mentioned above, the relationship between chromosomal DNA supercoiling and transcription is defined as a “two-way street” [13], meaning that these two processes are interdependent. Transcription has a direct impact on DNA topology as the transcribing RNAP induces positive supercoiling immediately downstream and negative supercoiling upstream of the transcription complex [73,120]. Furthermore, genes are often more efficiently transcribed from more underwound negatively supercoiled than from the more overwound positively supercoiled DNA due to the facilitated untwisting of the double helix and increased exposure of the promoter region on negatively supercoiled DNA [9,121]. Thus, the supercoil diffusion induced by transcribing RNAP can not only distinctly modulate the expression of the neighboring genes [74,122] but also act as an evolutionary force determining chromosomal gene arrangement [10]. The connection between transcription and nucleoid structure was most clearly exposed by combining molecular genetic approaches with high-resolution fluorescence microscopy. In particular, in both *E. coli* and *Bacillus subtilis* cells grown in rich media, it was reported that the accumulation of RNA polymerase molecules forms dense aggregates, so-called transcription foci, mostly engaged in rRNA synthesis [123–125]. Further investigations revealed that these clusters are preferentially enriched at the surface of the chromosome, leading to the proposal that actively transcribed regions are located at the periphery of the nucleoid [126]. A potential explanation for this is that while after transcription initiation, the nascent mRNA nucleates the recruitment of ribosomes, the resultant large DNA–RNAP–ribosome complexes are entropically excluded from the bulk of the DNA and tend to migrate to the nucleoid periphery [127,128] (Figure 6).

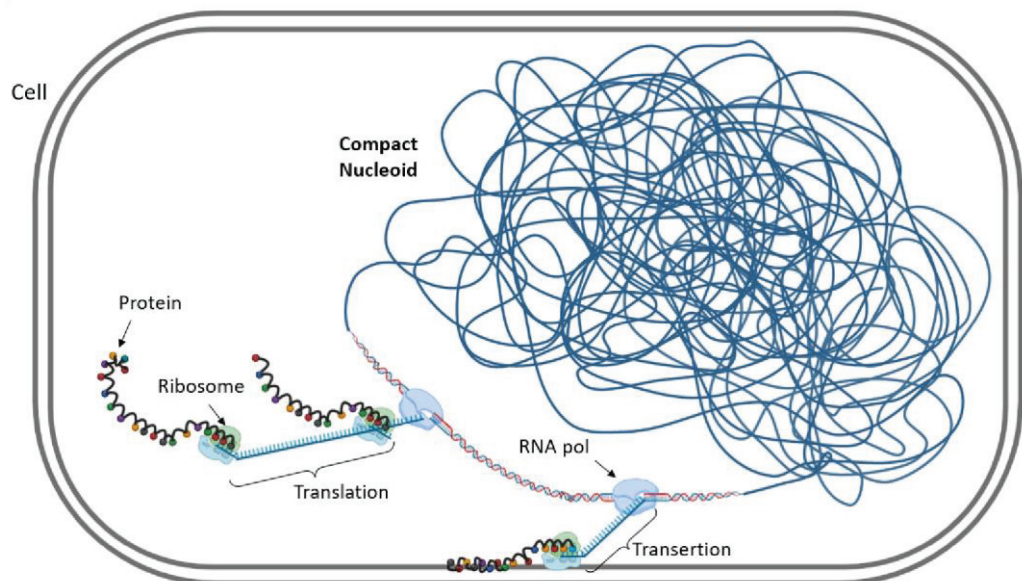


Figure 6. Impact of transcription on subcellular localization of genes. Transcription starts inside the nucleoid with formation of the RNAP–promoter complex. When the ribosome

binding site of mRNA is transcribed, free ribosomal subunits in the nucleoid region bind the mRNA. The DNA–RNAP– mRNA–ribosome complex moves at the periphery of the nucleoid for easy ribosome access. Some membrane proteins are produced by coupled transcription–translation membrane insertion, a process referred to as transertion and responsible for chromosome anchoring to the inner membrane.

However, this hypothesis was questioned by recent studies, which revealed that RNAP is able to form clusters in the presence of a limited number of *rrn* operons or in the absence of high levels of rRNA synthesis [11] and that the inhibition of gyrase activity leading to global DNA relaxation resulted in the redistribution of the RNAP clusters. It was thus postulated that it is primarily the underlying nucleoid structure rather than active transcription that directs the spatial distribution of RNA polymerase at the global level [11]. Notably, the organization of transcription foci requires the NAP HU, which modulates the genome-wide transcription [63] and is involved in both the maintenance of chromosomal supercoiling and facilitating the action of DNA gyrase [129,130]. Thus, HU is coordinately affecting the DNA supercoiling and chromosomal structure as well as gene expression. Given the direct impact of transcription on supercoiling [13,73,120] on the one hand, while the transcriptional activity of the RNAP holoenzyme depends on DNA superhelical density [23,72,131,132] on the other, it appears that NAPs, by virtue of their ability to constrain various supercoil structures, play a crucial role in coordinating chromosome configuration dynamics and genomic expression [17,19,133,134].

7. Conclusions

There is growing evidence that the different levels of DNA organization play roles in transcriptional regulation and that, in turn, transcription affects chromosome organization [1–4]. Thus, transcription and bacterial chromosome dynamics are interconnected and influence each other according to physiological and environmental conditions. Nevertheless, the role of nucleoid structural dynamics in changing the gene expression underlying the capacity of bacterial species to quickly adapt to altered environmental conditions is often underestimated. Further investigations are required to fully decipher the mechanistic basis of interconnections between transcription and chromosome structural dynamics, in particular, to clearly demonstrate their tight interdependence and reciprocal impact and identify the conditions and circumstances under which the action of one predominates over the other. The advent of powerful new instruments, methodologies and informatics tools for the deep analysis of complex data now give an extraordinary opportunity to advance in this important field dealing with the exploration of fundamental devices coordinating bacterial genetic expression.

Author Contributions: D.L.B., S.R., G.M. and W.N. contribute to writing, review and editing. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research received no external funding.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Dame, R.T.; Rashid, F.-Z.M.; Grainger, D.C. Chromosome organization in bacteria: Mechanistic insights into genome structure and function. *Nat. Rev. Genet.* **2020**, *21*, 227–242. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

2. Umbarger, M.A.; Toro, E.; Wright, M.A.; Porreca, G.J.; Baù, D.; Hong, S.-H.; Fero, M.J.; Zhu, L.J.; Marti-Renom, M.A.; McAdams, H.H.; et al. The three-dimensional architecture of a bacterial genome and its alteration by genetic perturbation. *Mol. Cell* **2011**, *44*, 252–264. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Wiggins, P.A.; Cheveralls, K.C.; Martin, J.S.; 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. [[CrossRef](#)]
4. Wray, N.R.; Ripke, S.; Mattheisen, M.; Trzaskowski, M.; Byrne, E.M.; Abdellaoui, A.; Adams, M.J.; Agerbo, E.; Air, T.M.; Andlauer, T.M.F.; et al. Genome-wide association analyses identify 44 risk variants and refine the genetic architecture of major depression. *Nat. Genet.* **2018**, *50*, 668–681. [[CrossRef](#)]
5. Sobetzko, P.; Travers, A.; Muskhelishvili, G. Gene order and chromosome dynamics coordinate spatiotemporal gene expression during the bacterial growth cycle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2012**, *109*, E42–E50. [[CrossRef](#)]
6. Kuhlman, T.E.; Cox, E.C. Gene location and DNA density determine transcription factor distributions in *Escherichia coli*. *Mol. Syst. Biol.* **2012**, *8*, 610. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Montero Llopis, P.; Jackson, A.F.; Sliusarenko, O.; Surovtsev, I.; Heinritz, J.; Emonet, T.; Jacobs-Wagner, C. Spatial organization of the flow of genetic information in bacteria. *Nature* **2010**, *466*, 77–81. [[CrossRef](#)]
8. Cabrera, N.; Casaña, P.; Cid, A.R.; Haya, S.; Moret, A.; Aznar, J.A. Novel missense mutation c.2685G>C (p.Q895H) in VWF gene associated with very low levels of VWF mRNA. *Ann. Hematol.* **2009**, *88*, 245–247. [[CrossRef](#)]
9. Shen, B.A.; Landick, R. Transcription of Bacterial Chromatin. *J. Mol. Biol.* **2019**, *431*, 4040–4066. [[CrossRef](#)]
10. Sobetzko, P. Transcription-coupled DNA supercoiling dictates the chromosomal arrangement of bacterial genes. *Nucleic Acids Res.* **2016**, *44*, 1514–1524. [[CrossRef](#)]
11. Weng, X.; Bohrer, C.H.; Bettridge, K.; Lagda, A.C.; Cagliero, C.; Jin, D.J.; Xiao, J. Spatial organization of RNA polymerase and its relationship with transcription in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2019**, *116*, 20115–20123. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Zhang, J.; Landick, R. A Two-Way Street: Regulatory Interplay between RNA Polymerase and Nascent RNA Structure. *Trends Biochem. Sci.* **2016**, *41*, 293–310. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Dorman, C.J. DNA supercoiling and transcription in bacteria: A two-way street. *BMC Mol. Cell Biol.* **2019**, *20*, 26. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Hołówka, J.; Zakrzewska-Czerwińska, J. Nucleoid Associated Proteins: The Small Organizers That Help to Cope with Stress. *Front. Microbiol.* **2020**, *11*, 590. [[CrossRef](#)]
15. Dillon, S.C.; Dorman, C.J. Bacterial nucleoid-associated proteins, nucleoid structure and gene expression. *Nat. Rev. Microbiol.* **2010**, *8*, 185–195. [[CrossRef](#)]
16. Dorman, C.J. Function of nucleoid-associated proteins in chromosome structuring and transcriptional regulation. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **2014**, *24*, 316–331. [[CrossRef](#)]
17. Rimsky, S.; Travers, A. Pervasive regulation of nucleoid structure and function by nucleoid-associated proteins. *Curr. Opin. Microbiol.* **2011**, *14*, 136–141. [[CrossRef](#)]
18. Taniguchi, S.; Kasho, K.; Ozaki, S.; Katayama, T. *Escherichia coli* CrfC Protein, a Nucleoid Partition Factor, Localizes to Nucleoid Poles via the Activities of Specific Nucleoid-Associated Proteins. *Front. Microbiol.* **2019**, *10*, 72. [[CrossRef](#)]
19. Blot, N.; Mavathur, R.; Geertz, M.; Travers, A.; Muskhelishvili, G. Homeostatic regulation of supercoiling sensitivity coordinates transcription of the bacterial genome. *EMBO Rep.* **2006**, *7*, 710–715. [[CrossRef](#)]
20. Ali Azam, T.; Iwata, A.; Nishimura, A.; Ueda, S.; Ishihama, A. Growth phase-dependent variation in protein composition of the *Escherichia coli* nucleoid. *J. Bacteriol.* **1999**, *181*, 6361–6370. [[CrossRef](#)]
21. Balke, V.L.; Gralla, J.D. Changes in the linking number of supercoiled DNA accompany growth transitions in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **1987**, *169*, 4499–4506. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Sonnenschein, N.; Geertz, M.; Muskhelishvili, G.; Hütt, M.-T. Analog regulation of metabolic demand. *BMC Syst. Biol.* **2011**, *5*, 40. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Travers, A.; Muskhelishvili, G. DNA supercoiling—A global transcriptional regulator for enterobacterial growth? *Nat. Rev. Microbiol.* **2005**, *3*, 157–169. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Hsieh, L.S.; Burger, R.M.; Drlica, K. Bacterial DNA supercoiling and [ATP]/[ADP]. Changes associated with a transition to anaerobic growth. *J. Mol. Biol.* **1991**, *219*, 443–450. [[CrossRef](#)]
25. Martis, B.S.; Forquet, R.; Reverchon, S.; Nasser, W.; Meyer, S. DNA Supercoiling: An Ancestral Regulator of Gene Expression in Pathogenic Bacteria? *Comput. Struct. Biotechnol. J.* **2019**, *17*, 1047–1055. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Maurer, S.; Fritz, J.; Muskhelishvili, G. A systematic in vitro study of nucleoprotein complexes formed by bacterial nucleoid-associated proteins revealing novel types of DNA organization. *J. Mol. Biol.* **2009**, *387*, 1261–1276. [[CrossRef](#)]
27. Prieto, A.I.; Kahramanoglu, C.; Ali, R.M.; Fraser, G.M.; Seshasayee, A.S.N.; Luscombe, N.M. Genomic analysis of DNA binding and gene regulation by homologous nucleoid-associated proteins IHF and HU in *Escherichia coli* K12. *Nucleic Acids Res.* **2012**, *40*, 3524–3537. [[CrossRef](#)]

28. Cameron, A.D.S.; Stoebel, D.M.; Dorman, C.J. DNA supercoiling is differentially regulated by environmental factors and FIS in *Escherichia coli* and *Salmonella enterica*. *Mol. Microbiol.* **2011**, *80*, 85–101. [[CrossRef](#)]
29. Jiang, X.; Sobetzko, P.; Nasser, W.; Reverchon, S.; Muskhelishvili, G. Chromosomal “stress-response” domains govern the spatiotemporal expression of the bacterial virulence program. *MBio* **2015**, *6*, e00353-15. [[CrossRef](#)]
30. Ouafa, Z.-A.; Reverchon, S.; Lautier, T.; Muskhelishvili, G.; Nasser, W. The nucleoid-associated proteins H-NS and FIS modulate the DNA supercoiling response of the *pel* genes, the major virulence factors in the plant pathogen bacterium *Dickeya dadantii*. *Nucleic Acids Res.* **2012**, *40*, 4306–4319. [[CrossRef](#)]
31. Reverchon, S.; Meyer, S.; Forquet, R.; Hommais, F.; Muskhelishvili, G.; Nasser, W. The nucleoid-associated protein IHF acts as a “transcriptional domainin” protein coordinating the bacterial virulence traits with global transcription. *Nucleic Acids Res.* **2021**, *49*, 776–790. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Atlung, T.; Ingmer, H. H-NS: A modulator of environmentally regulated gene expression. *Mol. Microbiol.* **1997**, *24*, 7–17. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Datta, C.; Jha, R.K.; Ahmed, W.; Ganguly, S.; Ghosh, S.; Nagaraja, V. Physical and functional interaction between nucleoid-associated proteins HU and Lsr2 of *Mycobacterium tuberculosis*: Altered DNA binding and gene regulation. *Mol. Microbiol.* **2019**, *111*, 981–994. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Mangan, M.W.; Lucchini, S.; Cróinín, T.Ó.; Fitzgerald, S.; Hinton, J.C.D.; Dorman, C.J. Nucleoid-associated protein HU controls three regulons that coordinate virulence, response to stress and general physiology in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Microbiology* **2011**, *157*, 1075–1087. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Zhao, X.; Shahul Hameed, U.F.; Kharchenko, V.; Liao, C.; Huser, F.; Remington, J.M.; Radhakrishnan, A.K.; Jaremko, M.; Jaremko, Ł.; Arold, S.T.; et al. Molecular basis for the adaptive evolution of environment-sensing by H-NS proteins. *Elife* **2021**, *10*, e57467. [[CrossRef](#)]
36. Bouffartigues, E.; Buckle, M.; Badaut, C.; Travers, A.; Rimsky, S. H-NS cooperative binding to high-affinity sites in a regulatory element results in transcriptional silencing. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2007**, *14*, 441–448. [[CrossRef](#)]
37. Lang, B.; Blot, N.; Bouffartigues, E.; Buckle, M.; Geertz, M.; Gualerzi, C.O.; Mavathur, R.; Muskhelishvili, G.; Pon, C.L.; Rimsky, S.; et al. High-affinity DNA binding sites for H-NS provide a molecular basis for selective silencing within proteobacterial genomes. *Nucleic Acids Res.* **2007**, *35*, 6330–6337. [[CrossRef](#)]
38. Castang, S.; McManus, H.R.; Turner, K.H.; Dove, S.L. H-NS family members function coordinately in an opportunistic pathogen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, *105*, 18947–18952. [[CrossRef](#)]
39. Falconi, M.; Colonna, B.; Prosseda, G.; Micheli, G.; Gualerzi, C.O. Thermoregulation of *Shigella* and *Escherichia coli* EIEC pathogenicity. A temperature-dependent structural transition of DNA modulates accessibility of *virF* promoter to transcriptional repressor H-NS. *EMBO J.* **1998**, *17*, 7033–7043. [[CrossRef](#)]
40. Nasser, W.; Faelen, M.; Hugouvieux-Cotte-Pattat, N.; Reverchon, S. Role of the nucleoid-associated protein H-NS in the synthesis of virulence factors in the phytopathogenic bacterium *Erwinia chrysanthemi*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **2001**, *14*, 10–20. [[CrossRef](#)]
41. Prosseda, G.; Fradiani, P.A.; Di Lorenzo, M.; Falconi, M.; Micheli, G.; Casalino, M.; Nicoletti, M.; Colonna, B. A role for H-NS in the regulation of the *virF* gene of *Shigella* and enteroinvasive *Escherichia coli*. *Res. Microbiol.* **1998**, *149*, 15–25. [[CrossRef](#)]
42. Tran, C.N.; Giangrossi, M.; Prosseda, G.; Brandi, A.; Di Martino, M.L.; Colonna, B.; Falconi, M. A multifactor regulatory circuit involving H-NS, *VirF* and an antisense RNA modulates transcription of the virulence gene *icsA* of *Shigella flexneri*. *Nucleic Acids Res.* **2011**, *39*, 8122–8134. [[CrossRef](#)]
43. Song, D.; Loparo, J.J. Building bridges within the bacterial chromosome. *Trends Genet.* **2015**, *31*, 164–173. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. van der Valk, R.A.; Vreede, J.; Qin, L.; Moolenaar, G.F.; Hofmann, A.; Goosen, N.; Dame, R.T. Mechanism of environmentally driven conformational changes that modulate H-NS DNA-bridging activity. *Elife* **2017**, *6*, e27369. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Shahul Hameed, U.F.; Liao, C.; Radhakrishnan, A.K.; Huser, F.; Aljedani, S.S.; Zhao, X.; Momin, A.A.; Melo, F.A.; Guo, X.; Brooks, C.; et al. H-NS uses an autoinhibitory conformational switch for environment-controlled gene silencing. *Nucleic Acids Res.* **2019**, *47*, 2666–2680. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Ross, W.; Thompson, J.F.; Newlands, J.T.; Gourse, R.L.E. *coli* Fis protein activates ribosomal RNA transcription in vitro and in vivo. *EMBO J.* **1990**, *9*, 3733–3742. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Schneider, R.; Travers, A.; Kutateladze, T.; Muskhelishvili, G. A DNA architectural protein couples cellular physiology and DNA topology in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **1999**, *34*, 953–964. [[CrossRef](#)]
48. Weinstein-Fischer, D.; Elgrably-Weiss, M.; Altuvia, S. *Escherichia coli* response to hydrogen peroxide: A role for DNA supercoiling, topoisomerase I and Fis. *Mol. Microbiol.* **2000**, *35*, 1413–1420. [[CrossRef](#)]
49. Schneider, R.; Travers, A.; Muskhelishvili, G. FIS modulates growth phase-dependent topological transitions of DNA in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **1997**, *26*, 519–530. [[CrossRef](#)]

50. Ball, C.A.; Osuna, R.; Ferguson, K.C.; Johnson, R.C. Dramatic changes in Fis levels upon nutrient upshift in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **1992**, *174*, 8043–8056. [[CrossRef](#)]
51. Browning, D.F.; Grainger, D.C.; Busby, S.J. Effects of nucleoid-associated proteins on bacterial chromosome structure and gene expression. *Curr. Opin. Microbiol.* **2010**, *13*, 773–780. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Goldberg, M.D.; Johnson, M.; Hinton, J.C.; Williams, P.H. Role of the nucleoid-associated protein Fis in the regulation of virulence properties of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **2001**, *41*, 549–559. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Falconi, M.; Prosseda, G.; Giangrossi, M.; Beghetto, E.; Colonna, B. Involvement of FIS in the H-NS-mediated regulation of virF gene of Shigella and enteroinvasive *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **2001**, *42*, 439–452. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Cróinín, T.O.; Carroll, R.K.; Kelly, A.; Dorman, C.J. Roles for DNA supercoiling and the Fis protein in modulating expression of virulence genes during intracellular growth of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Mol. Microbiol.* **2006**, *62*, 869–882. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Schechter, L.M.; Jain, S.; Akbar, S.; Lee, C.A. The small nucleoid-binding proteins H-NS, HU, and Fis affect hilA expression in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Infect. Immun.* **2003**, *71*, 5432–5435. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Lenz, D.H.; Bassler, B.L. The small nucleoid protein Fis is involved in *Vibrio cholerae* quorum sensing. *Mol. Microbiol.* **2007**, *63*, 859–871. [[CrossRef](#)]
57. Lautier, T.; Nasser, W. The DNA nucleoid-associated protein Fis co-ordinates the expression of the main virulence genes in the phytopathogenic bacterium *Erwinia chrysanthemi*. *Mol. Microbiol.* **2007**, *66*, 1474–1490. [[CrossRef](#)]
58. Sheridan, S.D.; Benham, C.J.; Hatfield, G.W. Activation of gene expression by a novel DNA structural transmission mechanism that requires supercoiling-induced DNA duplex destabilization in an upstream activating sequence. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 21298–21308. [[CrossRef](#)]
59. Mangan, M.W.; Lucchini, S.; Danino, V.; Cróinín, T.O.; Hinton, J.C.D.; Dorman, C.J. The integration host factor (IHF) integrates stationary-phase and virulence gene expression in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Mol. Microbiol.* **2006**, *59*, 1831–1847. [[CrossRef](#)]
60. Stonehouse, E.; Kovacikova, G.; Taylor, R.K.; Skorupski, K. Integration host factor positively regulates virulence gene expression in *Vibrio cholerae*. *J. Bacteriol.* **2008**, *190*, 4736–4748. [[CrossRef](#)]
61. Remesh, S.G.; Verma, S.C.; Chen, J.-H.; Ekman, A.A.; Larabell, C.A.; Adhya, S.; Hammel, M. Nucleoid remodeling during environmental adaptation is regulated by HU-dependent DNA bundling. *Nat. Commun.* **2020**, *11*, 2905. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
62. Oberto, J.; Nabti, S.; Jooste, V.; Mignot, H.; Rouviere-Yaniv, J. The HU regulon is composed of genes responding to anaerobiosis, acid stress, high osmolarity and SOS induction. *PLoS ONE* **2009**, *4*, e4367. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
63. Berger, M.; Farcas, A.; Geertz, M.; Zhelyazkova, P.; Brix, K.; Travers, A.; Muskhelishvili, G. Coordination of genomic structure and transcription by the main bacterial nucleoid-associated protein HU. *EMBO Rep.* **2010**, *11*, 59–64. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. Kroner, G.M.; Wolfe, M.B.; Freddolino, P.L. *Escherichia coli* Lrp Regulates One-Third of the Genome via Direct, Cooperative, and Indirect Routes. *J. Bacteriol.* **2019**, *201*, e00411-18. [[CrossRef](#)]
65. Tani, T.H.; Khodursky, A.; Blumenthal, R.M.; Brown, P.O.; Matthews, R.G. Adaptation to famine: A family of stationary-phase genes revealed by microarray analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 13471–13476. [[CrossRef](#)]
66. Corcoran, C.P.; Dorman, C.J. DNA relaxation-dependent phase biasing of the fim genetic switch in *Escherichia coli* depends on the interplay of H-NS, IHF and LRP. *Mol. Microbiol.* **2009**, *74*, 1071–1082. [[CrossRef](#)]
67. Engstrom, M.D.; Mobley, H.L.T. Regulation of Expression of Uropathogenic *Escherichia coli* Nonfimbrial Adhesin TosA by PapB Homolog TosR in Conjunction with H-NS and Lrp. *Infect. Immun.* **2016**, *84*, 811–821. [[CrossRef](#)]
68. Foer, D.; Zhu, M.; Cardone, R.L.; Simpson, C.; Sullivan, R.; Nemiroff, S.; Lee, G.; Kibbey, R.G.; Petersen, K.F.; Insogna, K.L. Impact of gain-of-function mutations in the low-density lipoprotein receptor-related protein 5 (LRP5) on glucose and lipid homeostasis. *Osteoporos. Int.* **2017**, *28*, 2011–2017. [[CrossRef](#)]
69. Browning, D.F.; Busby, S.J.W. Local and global regulation of transcription initiation in bacteria. *Nat. Rev. Microbiol.* **2016**, *14*, 638–650. [[CrossRef](#)]
70. Kröger, C.; MacKenzie, K.D.; Alshabib, E.Y.; Kirzinger, M.W.B.; Suchan, D.M.; Chao, T.-C.; Akulova, V.; Miranda-CasoLuengo, A.A.; Monzon, V.A.; Conway, T.; et al. The primary transcriptome, small RNAs and regulation of antimicrobial resistance in *Acinetobacter baumannii* ATCC 17978. *Nucleic Acids Res.* **2018**, *46*, 9684–9698. [[CrossRef](#)]
71. Meyer, S.; Reverchon, S.; Nasser, W.; Muskhelishvili, G. Chromosomal organization of transcription: In a nutshell. *Curr. Genet.* **2018**, *64*, 555–565. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
72. Kusano, S.; Ding, Q.; Fujita, N.; Ishihama, A. Promoter selectivity of *Escherichia coli* RNA polymerase E sigma 70 and E sigma 38 holoenzymes. Effect of DNA supercoiling. *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 1998–2004. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
73. Liu, L.F.; Wang, J.C. Supercoiling of the DNA template during transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1987**, *84*, 7024–7027. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

74. Zhi, X.; Dages, S.; Dages, K.; Liu, Y.; Hua, Z.-C.; Makemson, J.; Leng, F. Transient and dynamic DNA supercoiling potently stimulates the leu-500 promoter in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **2017**, *292*, 14566–14575. [[CrossRef](#)]
75. Conway, T.; Creecy, J.P.; Maddox, S.M.; Grissom, J.E.; Conkle, T.L.; Shadid, T.M.; Teramoto, J.; San Miguel, P.; Shimada, T.; Ishihama, A.; et al. Unprecedented high-resolution view of bacterial operon architecture revealed by RNA sequencing. *MBio* **2014**, *5*, e01442-14. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
76. Harden, T.T.; Herlambang, K.S.; Chamberlain, M.; Lalanne, J.-B.; Wells, C.D.; Li, G.-W.; Landick, R.; Hochschild, A.; Kondev, J.; Gelles, J. Alternative transcription cycle for bacterial RNA polymerase. *Nat. Commun.* **2020**, *11*, 448. [[CrossRef](#)]
77. Cevost, J.; Vaillant, C.; Meyer, S.; Rost, B. ThreaDNA: Predicting DNA mechanics' contribution to sequence selectivity of proteins along whole genomes. *Bioinformatics* **2018**, *34*, 609–616. [[CrossRef](#)]
78. Junier, I.; Rivoire, O. Conserved Units of Co-Expression in Bacterial Genomes: An Evolutionary Insight into Transcriptional Regulation. *PLoS ONE* **2016**, *11*, e0155740. [[CrossRef](#)]
79. Deato, M.D.E.; Marr, M.T.; Sottero, T.; Inouye, C.; Hu, P.; Tjian, R. MyoD targets TAF3/TRF3 to activate myogenin transcription. *Mol. Cell* **2008**, *32*, 96–105. [[CrossRef](#)]
80. Jeong, K.-H.; Chin, W.W.; Kaiser, U.B. Essential role of the homeodomain for pituitary homeobox 1 activation of mouse gonadotropin-releasing hormone receptor gene expression through interactions with c-Jun and DNA. *Mol. Cell. Biol.* **2004**, *24*, 6127–6139. [[CrossRef](#)]
81. Sonnenschein, N.; Hütt, M.-T.; Stoyan, H.; Stoyan, D. Ranges of control in the transcriptional regulation of *Escherichia coli*. *BMC Syst. Biol.* **2009**, *3*, 119. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
82. Muskhelishvili, G.; Travers, A. Integration of syntactic and semantic properties of the DNA code reveals chromosomes as thermodynamic machines converting energy into information. *Cell. Mol. Life Sci.* **2013**, *70*, 4555–4567. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
83. Postow, L.; Hardy, C.D.; Arsuaga, J.; Cozzarelli, N.R. Topological domain structure of the *Escherichia coli* chromosome. *Genes Dev.* **2004**, *18*, 1766–1779. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
84. Lesterlin, C.; Gigant, E.; Boccard, F.; Espéi, O. Sister chromatid interactions in bacteria revealed by a site-specific recombination assay. *EMBO J.* **2012**, *31*, 3468–3479. [[CrossRef](#)]
85. Wang, M.M. Notch signaling and Notch signaling modifiers. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2011**, *43*, 1550–1562. [[CrossRef](#)]
86. Yazdi, S.; Ardekani, A.M. Bacterial aggregation and biofilm formation in a vortical flow. *Biomicrofluidics* **2012**, *6*, 44114. [[CrossRef](#)]
87. Bouyioukos, C.; Reverchon, S.; Képès, F. From multiple pathogenicity islands to a unique organized pathogenicity archipelago. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 27978. [[CrossRef](#)]
88. Junier, P.; Molina, V.; Dorador, C.; Hadas, O.; Kim, O.-S.; Junier, T.; Witzel, J.-P.; Imhoff, J.F. Phylogenetic and functional marker genes to study ammonia-oxidizing microorganisms (AOM) in the environment. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2010**, *85*, 425–440. [[CrossRef](#)]
89. Képès, F. Periodic transcriptional organization of the *E.coli* genome. *J. Mol. Biol.* **2004**, *340*, 957–964. [[CrossRef](#)]
90. Képès, F.; Jester, B.C.; Lepage, T.; Rafiei, N.; Rosu, B.; Junier, I. The layout of a bacterial genome. *FEBS Lett.* **2012**, *586*, 2043–2048. [[CrossRef](#)]
91. Korotkov, K.V.; Sandkvist, M.; Hol, W.G.J. The type II secretion system: Biogenesis, molecular architecture and mechanism. *Nat. Rev. Microbiol.* **2012**, *10*, 336–351. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
92. Magaud, D.; Grandjean, C.; Doutheau, A.; Anker, D.; Shevchik, V.; Cotte-Pattat, N.; Robert-Baudouy, J. Synthesis of the two monomethyl esters of the disaccharide 4-O-alpha-D-galacturonosyl-D-galacturonic acid and of precursors for the preparation of higher oligomers methyl uronated in definite sequences. *Carbohydr. Res.* **1998**, *314*, 189–199. [[CrossRef](#)]
93. Nasser, W.; Reverchon, S.; Condemine, G.; Robert-Baudouy, J. Specific interactions of *Erwinia chrysanthemi* KdgR repressor with different operators of genes involved in pectinolysis. *J. Mol. Biol.* **1994**, *236*, 427–440. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
94. Reverchon, S.; Nasser, W.; Robert-Baudouy, J. Characterization of kdgR, a gene of *Erwinia chrysanthemi* that regulates pectin degradation. *Mol. Microbiol.* **1991**, *5*, 2203–2216. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
95. Brambilla, E.; Sclavi, B. Gene regulation by H-NS as a function of growth conditions depends on chromosomal position in *Escherichia coli*. *G3 Genes Genomes Genet.* **2015**, *5*, 605–614. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
96. Gerganova, V.; Berger, M.; Zaldastanishvili, E.; Sobetzko, P.; Lafon, C.; Mourez, M.; Travers, A.; Muskhelishvili, G. Chromosomal position shift of a regulatory gene alters the bacterial phenotype. *Nucleic Acids Res.* **2015**, *43*, 8215–8226. [[CrossRef](#)]
97. Fritsche, M.; Li, S.; Heermann, D.W.; Wiggins, P.A. A model for *Escherichia coli* chromosome packaging supports transcription factor-induced DNA domain formation. *Nucleic Acids Res.* **2012**, *40*, 972–980. [[CrossRef](#)]
98. Japaridze, A.; Yang, W.; Dekker, C.; Nasser, W.; Muskhelishvili, G. DNA sequence-directed cooperation between nucleoid-associated proteins. *IScience* **2021**, *24*, 102408. [[CrossRef](#)]
99. Lioy, V.S.; Boccard, F. Conformational Studies of Bacterial Chromosomes by High-Throughput Sequencing Methods. *Methods Enzymol.* **2018**, *612*, 25–45. [[CrossRef](#)]

100. Krogh, T.J.; Franke, A.; Møller-Jensen, J.; Kaleta, C. Elucidating the Influence of Chromosomal Architecture on Transcriptional Regulation in Prokaryotes—Observing Strong Local Effects of Nucleoid Structure on Gene Regulation. *Front. Microbiol.* **2020**, *11*, 2002. [[CrossRef](#)]
101. Booker, B.M.; Deng, S.; Higgins, N.P. DNA topology of highly transcribed operons in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Mol. Microbiol.* **2010**, *78*, 1348–1364. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
102. Higgins, N.P. RNA polymerase: Chromosome domain boundary maker and regulator of supercoil density. *Curr. Opin. Microbiol.* **2014**, *22*, 138–143. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
103. Moore, L.D.; Le, T.; Fan, G. DNA methylation and its basic function. *Neuropsychopharmacology* **2013**, *38*, 23–38. [[CrossRef](#)]
104. Dame, R.T.; Kalmykova, O.J.; Grainger, D.C. Chromosomal macrodomains and associated proteins: Implications for DNA organization and replication in gram negative bacteria. *PLoS Genet.* **2011**, *7*, e1002123. [[CrossRef](#)]
105. Scolari, V.F.; Bassetti, B.; Sclavi, B.; Lagomarsino, M.C. Gene clusters reflecting macrodomain structure respond to nucleoid perturbations. *Mol. Biosyst.* **2011**, *7*, 878–888. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
106. Ferrándiz, M.-J.; Martín-Galiano, A.J.; Schwartzman, J.B.; de la Campa, A.G. The genome of *Streptococcus pneumoniae* is organized in topology-reacting gene clusters. *Nucleic Acids Res.* **2010**, *38*, 3570–3581. [[CrossRef](#)]
107. Muskhelishvili, G.; Forquet, R.; Reverchon, S.; Meyer, S.; Nasser, W. Coherent Domains of Transcription Coordinate Gene Expression During Bacterial Growth and Adaptation. *Microorganisms* **2019**, *7*, 694. [[CrossRef](#)]
108. Wasim, A.; Gupta, A.; Mondal, J. A Hi-C data-integrated model elucidates *E. coli* chromosome’s multiscale organization at various replication stages. *Nucleic Acids Res.* **2021**, *49*, 3077–3091. [[CrossRef](#)]
109. Lioy, V.S.; Lorenzi, J.-N.; Najah, S.; Poinson, T.; Leh, H.; Saulnier, C.; Aigle, B.; Lautru, S.; Thibessard, A.; Lespinet, O.; et al. Dynamics of the compartmentalized *Streptomyces* chromosome during metabolic differentiation. *Nat. Commun.* **2021**, *12*, 5221. [[CrossRef](#)]
110. Le, T.B.; Laub, M.T. Transcription rate and transcript length drive formation of chromosomal interaction domain boundaries. *EMBO J.* **2016**, *35*, 1582–1595. [[CrossRef](#)]
111. Chereji, R.V.; Bharatula, V.; Elfving, N.; Blomberg, J.; Larsson, M.; Morozov, A.V.; Broach, J.R.; Björklund, S. Mediator binds to boundaries of chromosomal interaction domains and to proteins involved in DNA looping, RNA metabolism, chromatin remodeling, and actin assembly. *Nucleic Acids Res.* **2017**, *45*, 8806–8821. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
112. Marbouty, M.; Koszul, R. Metagenome Analysis Exploiting High-Throughput Chromosome Conformation Capture (3C) Data. *Trends Genet.* **2015**, *31*, 673–682. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
113. Trussart, M.; Yus, E.; Martinez, S.; Baù, D.; Tahara, Y.O.; Pengo, T.; Widjaja, M.; Kretschmer, S.; Swoger, J.; Djordjevic, S.; et al. Defined chromosome structure in the genome-reduced bacterium *Mycoplasma pneumoniae*. *Nat. Commun.* **2017**, *8*, 14665. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
114. Dugar, G.; Hofmann, A.; Heermann, D.W.; Hamoen, L.W. A chromosomal loop anchor mediates bacterial genome organization. *Nat. Genet.* **2022**, *54*, 194–201. [[CrossRef](#)]
115. Cagliero, C.; Grand, R.S.; Jones, M.B.; Jin, D.J.; O’Sullivan, J.M. Genome conformation capture reveals that the *Escherichia coli* chromosome is organized by replication and transcription. *Nucleic Acids Res.* **2013**, *41*, 6058–6071. [[CrossRef](#)]
116. Espeli, O.; Mercier, R.; Boccard, F. DNA dynamics vary according to macrodomain topography in the *E. coli* chromosome. *Mol. Microbiol.* **2008**, *68*, 1418–1427. [[CrossRef](#)]
117. Badrinarayanan, A.; Le, T.B.K.; Laub, M.T. Bacterial chromosome organization and segregation. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **2015**, *31*, 171–199. [[CrossRef](#)]
118. Jin, D.J.; Cagliero, C.; Martin, C.M.; Izard, J.; Zhou, Y.N. The dynamic nature and territory of transcriptional machinery in the bacterial chromosome. *Front. Microbiol.* **2015**, *6*, 497. [[CrossRef](#)]
119. Scholz, S.A.; Diao, R.; Wolfe, M.B.; Fivenson, E.M.; Lin, X.N.; Freddolino, P.L. High-Resolution Mapping of the *Escherichia coli* Chromosome Reveals Positions of High and Low Transcription. *Cell Syst.* **2019**, *8*, 212–225.e9. [[CrossRef](#)]
120. Ma, J.; Bai, L.; Wang, M.D. Transcription under torsion. *Science* **2013**, *340*, 1580–1583. [[CrossRef](#)]
121. Sobetzko, P.; Glinkowska, M.; Travers, A.; Muskhelishvili, G. DNA thermodynamic stability and supercoil dynamics determine the gene expression program during the bacterial growth cycle. *Mol. BioSyst.* **2013**, *9*, 1643–1651. [[CrossRef](#)]
122. Meyer, S.; Beslon, G. Torsion-mediated interaction between adjacent genes. *PLoS Comput. Biol.* **2014**, *10*, e1003785. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
123. Bremer, H.; Dennis, P.; Ehrenberg, M. Free RNA polymerase and modeling global transcription in *Escherichia coli*. *Biochimie* **2003**, *85*, 597–609. [[CrossRef](#)]

124. Jin, D.J.; Cabrera, J.E. Coupling the distribution of RNA polymerase to global gene regulation and the dynamic structure of the bacterial nucleoid in *Escherichia coli*. *J. Struct. Biol.* **2006**, *156*, 284–291. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
125. Jin, D.J.; Mata Martin, C.; Sun, Z.; Cagliero, C.; Zhou, Y.N. Nucleolus-like compartmentalization of the transcription machinery in fast-growing bacterial cells. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **2017**, *52*, 96–106. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
126. Stracy, M.; Lesterlin, C.; Garza de Leon, F.; Uphoff, S.; Zawadzki, P.; Kapanidis, A.N. Live-cell superresolution microscopy reveals the organization of RNA polymerase in the bacterial nucleoid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2015**, *112*, E4390–E4399. [[CrossRef](#)]
127. Bakshi, S.; Choi, H.; Mondal, J.; Weisshaar, J.C. Time-dependent effects of transcription- and translation-halting drugs on the spatial distributions of the *Escherichia coli* chromosome and ribosomes. *Mol. Microbiol.* **2014**, *94*, 871–887. [[CrossRef](#)]
128. Yang, S.; Kim, S.; Kim, D.-K.; Jeon An, H.; Bae Son, J.; Hedén Gynnå, A.; Ki Lee, N. Transcription and translation contribute to gene locus relocation to the nucleoid periphery in *E. coli*. *Nat. Commun.* **2019**, *10*, 5131. [[CrossRef](#)]
129. Ferrándiz, M.-J.; Carreño, D.; Ayora, S.; de la Campa, A. HU of *Streptococcus pneumoniae* Is Essential for the Preservation of DNA Supercoiling. *Front. Microbiol.* **2018**, *9*, 493. [[CrossRef](#)]
130. Malik, M.; Bensaid, A.; Rouviere-Yaniv, J.; Drlica, K. Histone-like protein HU and bacterial DNA topology: Suppression of an HU deficiency by gyrase mutations. *J. Mol. Biol.* **1996**, *256*, 66–76. [[CrossRef](#)]
131. Cannon, W.; Bordes, P.; Wigneshweraraj, S.R.; Buck, M. Nucleotide-dependent triggering of RNA polymerase-DNA interactions by an AAA regulator of transcription. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 19815–19825. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
132. Geertz, M.; Travers, A.; Mehandziska, S.; Sobetzko, P.; Chandra-Janga, S.; Shimamoto, N.; Muskhelishvili, G. Structural coupling between RNA polymerase composition and DNA supercoiling in coordinating transcription: A global role for the omega subunit? *MBio* **2011**, *2*, e00034-11. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
133. Ohniwa, R.L.; Ushijima, Y.; Saito, S.; Morikawa, K. Proteomic analyses of nucleoid-associated proteins in *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, and *Staphylococcus aureus*. *PLoS ONE* **2011**, *6*, e19172. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
134. Rafiei, N.; Cordova, M.; Navarre, W.W.; Milstein, J.N. Growth Phase-Dependent Chromosome Condensation and Heat-Stable Nucleoid-Structuring Protein Redistribution in *Escherichia coli* under Osmotic Stress. *J. Bacteriol.* **2019**, *201*, e00469-19. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

Partie VI : Références

- Azam, T.A., and 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. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.46.33105>.
- Badrinarayanan, A., Le, T.B.K., and Laub, M.T. (2015). Bacterial chromosome organization and segregation. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* *31*, 171–199. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-100814-125211>.
- Baker, T.A., Sekimizu, K., Funnell, B.E., and Kornberg, A. (1986). Extensive unwinding of the plasmid template during staged enzymatic initiation of DNA replication from the origin of the *Escherichia coli* chromosome. *Cell* *45*, 53–64. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(86\)90537-4](https://doi.org/10.1016/0092-8674(86)90537-4).
- Bakshi, S., Choi, H., Mondal, J., and Weisshaar, J.C. (2014). Time-dependent effects of transcription- and translation-halting drugs on the spatial distributions of the *Escherichia coli* chromosome and ribosomes. *Mol. Microbiol.* *94*, 871–887. <https://doi.org/10.1111/mmi.12805>.
- Bakshi, S., Choi, H., and Weisshaar, J.C. (2015). The spatial biology of transcription and translation in rapidly growing *Escherichia coli*. *Front. Microbiol.* *6*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00636>.
- Balandina, A., Claret, L., Hengge-Aronis, R., and Rouviere-Yaniv, J. (2001). The *Escherichia coli* histone-like protein HU regulates *rpoS* translation. *Mol. Microbiol.* *39*, 1069–1079. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2001.02305.x>.
- Berger, J.M. (1998). Structure of DNA topoisomerases. *Biochim. Biophys. Acta* *1400*, 3–18. [https://doi.org/10.1016/s0167-4781\(98\)00124-9](https://doi.org/10.1016/s0167-4781(98)00124-9).
- Berger, M., Farcas, A., Geertz, M., Zhelyazkova, P., Brix, K., Travers, A., and Muskhelishvili, G. (2010). Coordination of genomic structure and transcription by the main bacterial nucleoid-associated protein HU. *EMBO Rep.* *11*, 59–64. <https://doi.org/10.1038/embor.2009.232>.
- van Berkum, N.L., Lieberman-Aiden, E., Williams, L., Imakaev, M., Gnirke, A., Mirny, L.A., Dekker, J., and Lander, E.S. (2010). Hi-C: A Method to Study the Three-dimensional Architecture of Genomes. *J. Vis. Exp. JoVE* 1869. <https://doi.org/10.3791/1869>.
- Birnboim, H.C., and Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* *7*, 1513–1523. .
- Blattner, F.R., Plunkett, G., Bloch, C.A., Perna, N.T., Burland, V., Riley, M., Collado-Vides, J., Glasner, J.D., Rode, C.K., Mayhew, G.F., et al. (1997). The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science* *277*, 1453–1462. <https://doi.org/10.1126/science.277.5331.1453>.
- Blin, P., Robic, K., Khayi, S., Cigna, J., Munier, E., Dewaegeneire, P., Laurent, A., Jaszczyszyn, Y., Hong, K.-W., Chan, K.-G., et al. (2021). Pattern and causes of the establishment of the invasive bacterial potato pathogen *Dickeya solani* and of the maintenance of the resident pathogen *D. dianthicola*. *Mol. Ecol.* *30*, 608–624. <https://doi.org/10.1111/mec.15751>.
- Blot, N., Mavathur, R., Geertz, M., Travers, A., and Muskhelishvili, G. (2006). Homeostatic regulation of supercoiling sensitivity coordinates transcription of the bacterial genome. *EMBO Rep.* *7*, 710–715. <https://doi.org/10.1038/sj.embor.7400729>.
- Booker, B.M., Deng, S., and Higgins, N.P. (2010). DNA topology of highly transcribed operons in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Mol. Microbiol.* *78*, 1348–1364. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2010.07394.x>.

- Bouet, J.Y., Surtees, J.A., and Funnell, B.E. (2000). Stoichiometry of P1 plasmid partition complexes. *J. Biol. Chem.* *275*, 8213–8219. <https://doi.org/10.1074/jbc.275.11.8213>.
- Bouffartigues, E., Buckle, M., Badaut, C., Travers, A., and Rimsky, S. (2007). H-NS cooperative binding to high-affinity sites in a regulatory element results in transcriptional silencing. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *14*, 441–448. <https://doi.org/10.1038/nsmb1233>.
- Boughammoura, A., Matzanke, B.F., Böttger, L., Reverchon, S., Lesuisse, E., Expert, D., and Franza, T. (2008). Differential role of ferritins in iron metabolism and virulence of the plant-pathogenic bacterium *Erwinia chrysanthemi* 3937. *J. Bacteriol.* *190*, 1518–1530. <https://doi.org/10.1128/JB.01640-07>.
- Bouyioukos, C., Reverchon, S., and Képès, F. (2016). From multiple pathogenicity islands to a unique organized pathogenicity archipelago. *Sci. Rep.* *6*, 27978. <https://doi.org/10.1038/srep27978>.
- Bremer, H., Dennis, P., and Ehrenberg, M. (2003). Free RNA polymerase and modeling global transcription in *Escherichia coli*. *Biochimie* *85*, 597–609. [https://doi.org/10.1016/s0300-9084\(03\)00105-6](https://doi.org/10.1016/s0300-9084(03)00105-6).
- Browning, D.F., and Busby, S.J. (2004). The regulation of bacterial transcription initiation. *Nat. Rev. Microbiol.* *2*, 57–65. <https://doi.org/10.1038/nrmicro787>.
- Browning, D.F., Grainger, D.C., and Busby, S.J. (2010). Effects of nucleoid-associated proteins on bacterial chromosome structure and gene expression. *Curr. Opin. Microbiol.* *13*, 773–780. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2010.09.013>.
- Busby, S., and Ebright, R.H. (1994). Promoter structure, promoter recognition, and transcription activation in prokaryotes. *Cell* *79*, 743–746. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(94\)90063-9](https://doi.org/10.1016/0092-8674(94)90063-9).
- Cabrera, N., Casaña, P., Cid, A.R., Haya, S., Moret, A., and Aznar, J.A. (2009). Novel missense mutation c.2685G>C (p.Q895H) in VWF gene associated with very low levels of VWF mRNA. *Ann. Hematol.* *88*, 245–247. <https://doi.org/10.1007/s00277-008-0576-7>.
- Cagliero, C., Grand, R.S., Jones, M.B., Jin, D.J., and O’Sullivan, J.M. (2013). Genome conformation capture reveals that the *Escherichia coli* chromosome is organized by replication and transcription. *Nucleic Acids Res.* *41*, 6058–6071. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt325>.
- Cameron, A.D.S., Stoebel, D.M., and Dorman, C.J. (2011). DNA supercoiling is differentially regulated by environmental factors and FIS in *Escherichia coli* and *Salmonella enterica*. *Mol. Microbiol.* *80*, 85–101. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2011.07560.x>.
- Castang, S., McManus, H.R., Turner, K.H., and Dove, S.L. (2008). H-NS family members function coordinately in an opportunistic pathogen. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *105*, 18947–18952. <https://doi.org/10.1073/pnas.0808215105>.
- Charkowski, A., Blanco, C., Condemine, G., Expert, D., Franza, T., Hayes, C., Hugouvieux-Cotte-Pattat, N., López Solanilla, E., Low, D., Moleleki, L., et al. (2012). The role of secretion systems and small molecules in soft-rot *Enterobacteriaceae* pathogenicity. *Annu. Rev. Phytopathol.* *50*, 425–449. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-081211-173013>.
- Choquet, G., Jehan, N., Pissavin, C., Blanco, C., and Jebbar, M. (2005). OusB, a broad-specificity ABC-type transporter from *Erwinia chrysanthemi*, mediates uptake of glycine betaine and choline with a

- high affinity. *Appl. Environ. Microbiol.* *71*, 3389–3398. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.7.3389-3398.2005>.
- Condemine, G., and Robert-Baudouy, J. (1991). Analysis of an *Erwinia chrysanthemi* gene cluster involved in pectin degradation. *Mol. Microbiol.* *5*, 2191–2202. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1991.tb02149.x>.
- Condemine, G., Dorel, C., Hugouvieux-Cotte-Pattat, N., and Robert-Baudouy, J. (1992). Some of the out genes involved in the secretion of pectate lyases in *Erwinia chrysanthemi* are regulated by *kdgR*. *Mol. Microbiol.* *6*, 3199–3211. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1992.tb01775.x>.
- Condemine, G., Castillo, A., Passeri, F., and Enard, C. (1999). The PecT repressor coregulates synthesis of exopolysaccharides and virulence factors in *Erwinia chrysanthemi*. *Mol. Plant-Microbe Interact. MPMI* *12*, 45–52. <https://doi.org/10.1094/MPMI.1999.12.1.45>.
- Corcoran, C.P., and Dorman, C.J. (2009). DNA relaxation-dependent phase biasing of the *fim* genetic switch in *Escherichia coli* depends on the interplay of H-NS, IHF and LRP. *Mol. Microbiol.* *74*, 1071–1082. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2009.06919.x>.
- Czajkowski, R., de Boer, W.J., Velvis, H., and van der Wolf, J.M. (2010). Systemic colonization of potato plants by a soilborne, green fluorescent protein-tagged strain of *Dickeya* sp. biovar 3. *Phytopathology* *100*, 134–142. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-100-2-0134>.
- Dabrazhynetskaya, A., Brendler, T., Ji, X., and Austin, S. (2009). Switching protein-DNA recognition specificity by single-amino-acid substitutions in the P1 par family of plasmid partition elements. *J. Bacteriol.* *191*, 1126–1131. <https://doi.org/10.1128/JB.01358-08>.
- Dame, R.T., and Goosen, N. (2002). HU: promoting or counteracting DNA compaction? *FEBS Lett.* *529*, 151–156. [https://doi.org/10.1016/s0014-5793\(02\)03363-x](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(02)03363-x).
- Dame, R.T., Kalmykova, O.J., and Grainger, D.C. (2011). Chromosomal macrodomains and associated proteins: implications for DNA organization and replication in gram negative bacteria. *PLoS Genet.* *7*, e1002123. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002123>.
- Dame, R.T., Rashid, F.-Z.M., and Grainger, D.C. (2020). Chromosome organization in bacteria: mechanistic insights into genome structure and function. *Nat. Rev. Genet.* *21*, 227–242. <https://doi.org/10.1038/s41576-019-0185-4>.
- Datta, C., Jha, R.K., Ahmed, W., Ganguly, S., Ghosh, S., and Nagaraja, V. (2019). Physical and functional interaction between nucleoid-associated proteins HU and Lsr2 of *Mycobacterium tuberculosis*: altered DNA binding and gene regulation. *Mol. Microbiol.* *111*, 981–994. <https://doi.org/10.1111/mmi.14202>.
- Delius, H., and Worcel, A. (1974). Electron microscopic studies on the folded chromosome of *Escherichia coli*. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* *38*, 53–58. <https://doi.org/10.1101/sqb.1974.038.01.008>.
- Dillon, S.C., and Dorman, C.J. (2010). Bacterial nucleoid-associated proteins, nucleoid structure and gene expression. *Nat. Rev. Microbiol.* *8*, 185–195. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2261>.
- Dorman, C.J. (2014). Function of nucleoid-associated proteins in chromosome structuring and transcriptional regulation. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* *24*, 316–331. <https://doi.org/10.1159/000368850>.

- Dorman, C.J. (2019). DNA supercoiling and transcription in bacteria: a two-way street. *BMC Mol. Cell Biol.* *20*, 26. <https://doi.org/10.1186/s12860-019-0211-6>.
- Dorman, C.J., and Corcoran, C.P. (2009). Bacterial DNA topology and infectious disease. *Nucleic Acids Res.* *37*, 672–678. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn996>.
- Dorman, C.J., and Deighan, P. (2003). Regulation of gene expression by histone-like proteins in bacteria. *Curr. Opin. Genet. Dev.* *13*, 179–184. [https://doi.org/10.1016/s0959-437x\(03\)00025-x](https://doi.org/10.1016/s0959-437x(03)00025-x).
- Ducret, A., Quardokus, E.M., and Brun, Y.V. (2016). MicrobeJ, a tool for high throughput bacterial cell detection and quantitative analysis. *Nat. Microbiol.* *1*, 16077. <https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2016.77>.
- Dugar, G., Hofmann, A., Heermann, D.W., and Hamoen, L.W. (2022). A chromosomal loop anchor mediates bacterial genome organization. *Nat. Genet.* *54*, 194–201. <https://doi.org/10.1038/s41588-021-00988-8>.
- Ebright, R.H. (2000). RNA polymerase: structural similarities between bacterial RNA polymerase and eukaryotic RNA polymerase II. *J. Mol. Biol.* *304*, 687–698. <https://doi.org/10.1006/jmbi.2000.4309>.
- Enard, C., Diolez, A., and Expert, D. (1988). Systemic virulence of *Erwinia chrysanthemi* 3937 requires a functional iron assimilation system. *J. Bacteriol.* *170*, 2419–2426. <https://doi.org/10.1128/jb.170.6.2419-2426.1988>.
- Engstrom, M.D., and Mobley, H.L.T. (2016). Regulation of Expression of Uropathogenic *Escherichia coli* Nonfimbrial Adhesin TosA by PapB Homolog TosR in Conjunction with H-NS and Lrp. *Infect. Immun.* *84*, 811–821. <https://doi.org/10.1128/IAI.01302-15>.
- 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. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2008.06239.x>.
- Falconi, M., Colonna, B., Prosseda, G., Micheli, G., and Gualerzi, C.O. (1998). Thermoregulation of *Shigella* and *Escherichia coli* EIEC pathogenicity. A temperature-dependent structural transition of DNA modulates accessibility of virF promoter to transcriptional repressor H-NS. *EMBO J.* *17*, 7033–7043. <https://doi.org/10.1093/emboj/17.23.7033>.
- Falconi, M., Prosseda, G., Giangrossi, M., Beghetto, E., and Colonna, B. (2001). Involvement of FIS in the H-NS-mediated regulation of virF gene of *Shigella* and enteroinvasive *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* *42*, 439–452. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2001.02646.x>.
- Ferrándiz, M.-J., Martín-Galiano, A.J., Schwartzman, J.B., and de la Campa, A.G. (2010). The genome of *Streptococcus pneumoniae* is organized in topology-reacting gene clusters. *Nucleic Acids Res.* *38*, 3570–3581. <https://doi.org/10.1093/nar/gkq106>.
- Fisher, J.K., Bourniquel, A., Witz, G., Weiner, B., Prentiss, M., and Kleckner, N. (2013). Four-dimensional imaging of *E. coli* nucleoid organization and dynamics in living cells. *Cell* *153*, 882–895. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.04.006>.
- Foer, D., Zhu, M., Cardone, R.L., Simpson, C., Sullivan, R., Nemiroff, S., Lee, G., Kibbey, R.G., Petersen, K.F., and Insogna, K.L. (2017). Impact of gain-of-function mutations in the low-density lipoprotein receptor-related protein 5 (LRP5) on glucose and lipid homeostasis. *Osteoporos. Int. J. Establ. Result*

Coop. Eur. Found. Osteoporos. Natl. Osteoporos. Found. USA 28, 2011–2017.
<https://doi.org/10.1007/s00198-017-3977-4>.

Follmann, M., Ochrombel, I., Krämer, R., Trötschel, C., Poetsch, A., Rückert, C., Hüser, A., Persicke, M., Seiferling, D., Kalinowski, J., et al. (2009). Functional genomics of pH homeostasis in *Corynebacterium glutamicum* revealed novel links between pH response, oxidative stress, iron homeostasis and methionine synthesis. *BMC Genomics* 10, 621. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-10-621>.

Forquet, R., Jiang, X., Nasser, W., Hommais, F., Reverchon, S., and Meyer, S. (2022). Mapping the Complex Transcriptional Landscape of the Phytopathogenic Bacterium *Dickeya dadantii*. *MBio* e0052422. <https://doi.org/10.1128/mbio.00524-22>.

Franza, T., Michaud-Soret, I., Piquerel, P., and Expert, D. (2002). Coupling of iron assimilation and pectinolysis in *Erwinia chrysanthemi* 3937. *Mol. Plant-Microbe Interact. MPMI* 15, 1181–1191. <https://doi.org/10.1094/MPMI.2002.15.11.1181>.

Free, A., and Dorman, C.J. (1995). Coupling of *Escherichia coli* hns mRNA levels to DNA synthesis by autoregulation: implications for growth phase control. *Mol. Microbiol.* 18, 101–113. https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1995.mmi_18010101.x.

Fritsche, M., Li, S., Heermann, D.W., and Wiggins, P.A. (2012). A model for *Escherichia coli* chromosome packaging supports transcription factor-induced DNA domain formation. *Nucleic Acids Res.* 40, 972–980. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr779>.

Gaal, T., Ross, W., Estrem, S.T., Nguyen, L.H., Burgess, R.R., and Gourse, R.L. (2001). Promoter recognition and discrimination by σ^{70} RNA polymerase. *Mol. Microbiol.* 42, 939–954. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2001.02703.x>.

Gellert, M., Mizuuchi, K., O’Dea, M.H., and Nash, H.A. (1976). DNA gyrase: an enzyme that introduces superhelical turns into DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 73, 3872–3876. <https://doi.org/10.1073/pnas.73.11.3872>.

Glasner, J.D., Yang, C.-H., Reverchon, S., Hugouvieux-Cotte-Pattat, N., Condemine, G., Bohin, J.-P., Van Gijsegem, F., Yang, S., Franza, T., Expert, D., et al. (2011). Genome sequence of the plant-pathogenic bacterium *Dickeya dadantii* 3937. *J. Bacteriol.* 193, 2076–2077. <https://doi.org/10.1128/JB.01513-10>.

Golanowska, M., Potrykus, M., Motyka-Pomagruk, A., Kabza, M., Bacci, G., Galardini, M., Bazzicalupo, M., Makalowska, I., Smalla, K., Mengoni, A., et al. (2018). Comparison of Highly and Weakly Virulent *Dickeya solani* Strains, With a View on the Pangenome and Panregulon of This Species. *Front. Microbiol.* 9, 1940. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01940>.

Goldberg, M.D., Johnson, M., Hinton, J.C., and Williams, P.H. (2001). Role of the nucleoid-associated protein Fis in the regulation of virulence properties of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 41, 549–559. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2001.02526.x>.

Goude, R., Renaud, S., Bonnassie, S., Bernard, T., and Blanco, C. (2004). Glutamine, glutamate, and alpha-glucosylglycerate are the major osmotic solutes accumulated by *Erwinia chrysanthemi* strain 3937. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 6535–6541. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.11.6535-6541.2004>.

- Gouesbet, G., Trautwetter, A., Bonnassie, S., Wu, L.F., and Blanco, C. (1996). Characterization of the *Erwinia chrysanthemi* osmoprotectant transporter gene *ousA*. *J. Bacteriol.* *178*, 447–455. <https://doi.org/10.1128/jb.178.2.447-455.1996>.
- Grenier, A.-M., Duport, G., Pagès, S., Condemine, G., and Rahbé, Y. (2006). The phytopathogen *Dickeya dadantii* (*Erwinia chrysanthemi* 3937) is a pathogen of the pea aphid. *Appl. Environ. Microbiol.* *72*, 1956–1965. <https://doi.org/10.1128/AEM.72.3.1956-1965.2006>.
- Gross, C.A., Chan, C., Dombroski, A., Gruber, T., Sharp, M., Tupy, J., and Young, B. (1998). The functional and regulatory roles of sigma factors in transcription. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* *63*, 141–155. <https://doi.org/10.1101/sqb.1998.63.141>.
- Gu, S., Shevchik, V.E., Shaw, R., Pickersgill, R.W., and Garnett, J.A. (2017). The role of intrinsic disorder and dynamics in the assembly and function of the type II secretion system. *Biochim. Biophys. Acta Proteins Proteomics* *1865*, 1255–1266. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2017.07.006>.
- Hall, D., and Minton, A.P. (2003). Macromolecular crowding: qualitative and semiquantitative successes, quantitative challenges. *Biochim. Biophys. Acta* *1649*, 127–139. [https://doi.org/10.1016/s1570-9639\(03\)00167-5](https://doi.org/10.1016/s1570-9639(03)00167-5).
- Hauben, L., Moore, E.R., Vauterin, L., Steenackers, M., Mergaert, J., Verdonck, L., and Swings, J. (1998). Phylogenetic position of phytopathogens within the Enterobacteriaceae. *Syst. Appl. Microbiol.* *21*, 384–397. [https://doi.org/10.1016/S0723-2020\(98\)80048-9](https://doi.org/10.1016/S0723-2020(98)80048-9).
- Hayes, E.T., Wilks, J.C., Sanfilippo, P., Yohannes, E., Tate, D.P., Jones, B.D., Radmacher, M.D., BonDurant, S.S., and Slonczewski, J.L. (2006). Oxygen limitation modulates pH regulation of catabolism and hydrogenases, multidrug transporters, and envelope composition in *Escherichia coli* K-12. *BMC Microbiol.* *6*, 89. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-6-89>.
- Hérault, E., Reverchon, S., and Nasser, W. (2014). Role of the LysR-type transcriptional regulator PecT and DNA supercoiling in the thermoregulation of *pel* genes, the major virulence factors in *Dickeya dadantii*. *Environ. Microbiol.* *16*, 734–745. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12198>.
- Higgins, N.P. (2014). RNA polymerase: chromosome domain boundary maker and regulator of supercoil density. *Curr. Opin. Microbiol.* *22*, 138–143. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2014.10.002>.
- Hołówka, J., and Zakrzewska-Czerwińska, J. (2020). Nucleoid Associated Proteins: The Small Organizers That Help to Cope With Stress. *Front. Microbiol.* *11*, 590. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00590>.
- Hommais, F., Oger-Desfeux, C., Van Gijsegem, F., Castang, S., Ligor, S., Expert, D., Nasser, W., and Reverchon, S. (2008). PecS is a global regulator of the symptomatic phase in the phytopathogenic bacterium *Erwinia chrysanthemi* 3937. *J. Bacteriol.* *190*, 7508–7522. <https://doi.org/10.1128/JB.00553-08>.
- Hommais, F., Zghidi-Abouzid, O., Oger-Desfeux, C., Pineau-Chapelle, E., Van Gijsegem, F., Nasser, W., and Reverchon, S. (2011). *lpxC* and *yafS* are the most suitable internal controls to normalize real time RT-qPCR expression in the phytopathogenic bacteria *Dickeya dadantii*. *PLoS One* *6*, e20269. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0020269>.
- Horiuchi, H., Takagi, M., and Yano, K. (1984). Relaxation of supercoiled plasmid DNA by oxidative stresses in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* *160*, 1017–1021. <https://doi.org/10.1128/jb.160.3.1017-1021.1984>.

- Hughes, K.T., and Mathee, K. (1998). The anti-sigma factors. *Annu. Rev. Microbiol.* 52, 231–286. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.52.1.231>.
- Hugouvieux-Cotte-Pattat, N., and Van Gijsegem, F. (2021). Diversity within the *Dickeya zeae* complex, identification of *Dickeya zeae* and *Dickeya oryzae* members, proposal of the novel species *Dickeya parazeae* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 71. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.005059>.
- Hugouvieux-Cotte-Pattat, N., Condemine, G., Nasser, W., and Reverchon, S. (1996). Regulation of pectinolysis in *Erwinia chrysanthemi*. *Annu. Rev. Microbiol.* 50, 213–257. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.50.1.213>.
- Hugouvieux-Cotte-Pattat, N., Jacot-des-Combes, C., and Briolay, J. (2019). *Dickeya lacustris* sp. nov., a water-living pectinolytic bacterium isolated from lakes in France. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 69, 721–726. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.003208>.
- Hugouvieux-Cotte-Pattat, N., Brochier-Armanet, C., Flandrois, J.-P., and Reverchon, S. (2020). *Dickeya poaceiphila* sp. nov., a plant-pathogenic bacterium isolated from sugar cane (*Saccharum officinarum*). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 70, 4508–4514. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004306>.
- Ishihama, A. (2000). Functional modulation of *Escherichia coli* RNA polymerase. *Annu. Rev. Microbiol.* 54, 499–518. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.54.1.499>.
- Jeong, J.-Y., Yim, H.-S., Ryu, J.-Y., Lee, H.S., Lee, J.-H., Seen, D.-S., and Kang, S.G. (2012). One-step sequence- and ligation-independent cloning as a rapid and versatile cloning method for functional genomics studies. *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 5440–5443. <https://doi.org/10.1128/AEM.00844-12>.
- Jiang, X., Sobetzko, P., Nasser, W., Reverchon, S., and Muskhelishvili, G. (2015). Chromosomal “stress-response” domains govern the spatiotemporal expression of the bacterial virulence program. *MBio* 6, e00353-00315. <https://doi.org/10.1128/mBio.00353-15>.
- Jiang, X., Zghidi-Abouzid, O., Oger-Desfeux, C., Hommais, F., Greliche, N., Muskhelishvili, G., Nasser, W., and Reverchon, S. (2016). Global transcriptional response of *Dickeya dadantii* to environmental stimuli relevant to the plant infection. *Environ. Microbiol.* 18, 3651–3672. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.13267>.
- Jin, D.J., and Cabrera, J.E. (2006). Coupling the distribution of RNA polymerase to global gene regulation and the dynamic structure of the bacterial nucleoid in *Escherichia coli*. *J. Struct. Biol.* 156, 284–291. <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2006.07.005>.
- Jin, D.J., Mata Martin, C., Sun, Z., Cagliero, C., and Zhou, Y.N. (2017). Nucleolus-like compartmentalization of the transcription machinery in fast-growing bacterial cells. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 52, 96–106. <https://doi.org/10.1080/10409238.2016.1269717>.
- Johnson, E.P., Yao, S., and Helinski, D.R. (2005). Gyrase inhibitors and thymine starvation disrupt the normal pattern of plasmid RK2 localization in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 187, 3538–3547. <https://doi.org/10.1128/JB.187.10.3538-3547.2005>.
- Kannaiah, S., Livny, J., and Amster-Choder, O. (2019). Spatiotemporal Organization of the *E. coli* Transcriptome: Translation Independence and Engagement in Regulation. *Mol. Cell* 76, 574-589.e7. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2019.08.013>.
- Kavenoff, R., and Bowen, B.C. (1976). Electron microscopy of membrane-free folded chromosomes from *Escherichia coli*. *Chromosoma* 59, 89–101. <https://doi.org/10.1007/BF00328479>.

- Kavenoff, R., and Ryder, O.A. (1976). Electron microscopy of membrane-associated folded chromosomes of *Escherichia coli*. *Chromosoma* 55, 13–25. <https://doi.org/10.1007/BF00288323>.
- Korkmazhan, E., Teimouri, H., Peterman, N., and Levine, E. (2017). Dynamics of translation can determine the spatial organization of membrane-bound proteins and their mRNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 114, 13424–13429. <https://doi.org/10.1073/pnas.1700941114>.
- Kotoujansky, A., Lemattre, M., and Boistard, P. (1982). Utilization of a thermosensitive episome bearing transposon TN10 to isolate Hfr donor strains of *Erwinia carotovora* subsp. *chrysanthemi*. *J. Bacteriol.* 150, 122–131. <https://doi.org/10.1128/jb.150.1.122-131.1982>.
- Kröger, C., MacKenzie, K.D., Alshabib, E.Y., Kirzinger, M.W.B., Suchan, D.M., Chao, T.-C., Akulova, V., Miranda-CasoLuengo, A.A., Monzon, V.A., Conway, T., et al. (2018). The primary transcriptome, small RNAs and regulation of antimicrobial resistance in *Acinetobacter baumannii* ATCC 17978. *Nucleic Acids Res.* 46, 9684–9698. <https://doi.org/10.1093/nar/gky603>.
- Krogh, T.J., Møller-Jensen, J., and Kaleta, C. (2018). Impact of Chromosomal Architecture on the Function and Evolution of Bacterial Genomes. *Front. Microbiol.* 9. .
- Kroner, G.M., Wolfe, M.B., and Freddolino, P.L. (2019). *Escherichia coli* Lrp Regulates One-Third of the Genome via Direct, Cooperative, and Indirect Routes. *J. Bacteriol.* 201, e00411-18. <https://doi.org/10.1128/JB.00411-18>.
- Kuhlman, T.E., and Cox, E.C. (2012). Gene location and DNA density determine transcription factor distributions in *Escherichia coli*. *Mol. Syst. Biol.* 8, 610. <https://doi.org/10.1038/msb.2012.42>.
- Lang, B., Blot, N., Bouffartigues, E., Buckle, M., Geertz, M., Gualerzi, C.O., Mavathur, R., Muskhelishvili, G., Pon, C.L., Rimsky, S., et al. (2007). High-affinity DNA binding sites for H-NS provide a molecular basis for selective silencing within proteobacterial genomes. *Nucleic Acids Res.* 35, 6330–6337. <https://doi.org/10.1093/nar/gkm712>.
- Lautier, T., and Nasser, W. (2007). The DNA nucleoid-associated protein Fis co-ordinates the expression of the main virulence genes in the phytopathogenic bacterium *Erwinia chrysanthemi*. *Mol. Microbiol.* 66, 1474–1490. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2007.06012.x>.
- Le Berre, D., Reverchon, S., Muskhelishvili, G., and Nasser, W. (2022). Relationship between the Chromosome Structural Dynamics and Gene Expression—A Chicken and Egg Dilemma? *Microorganisms* 10, 846. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10050846>.
- Lee, K., Huang, X., Yang, C., Lee, D., Ho, V., Nobuta, K., Fan, J.-B., and Wang, K. (2013). A genome-wide survey of highly expressed non-coding RNAs and biological validation of selected candidates in *Agrobacterium tumefaciens*. *PloS One* 8, e70720. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0070720>.
- Lemon, K.P., Kurtser, I., and Grossman, A.D. (2001). Effects of replication termination mutants on chromosome partitioning in *Bacillus subtilis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 212–217. <https://doi.org/10.1073/pnas.98.1.212>.
- Lenz, D.H., and Bassler, B.L. (2007). The small nucleoid protein Fis is involved in *Vibrio cholerae* quorum sensing. *Mol. Microbiol.* 63, 859–871. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2006.05545.x>.
- Lesterlin, C., and Duabry, N. (2016). Investigating Bacterial Chromosome Architecture. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* 1431, 61–72. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3631-1_6.

- Lesterlin, C., Gigant, E., Boccard, F., and Espéli, O. (2012). Sister chromatid interactions in bacteria revealed by a site-specific recombination assay. *EMBO J.* *31*, 3468–3479. <https://doi.org/10.1038/emboj.2012.194>.
- Létoffé, S., Delepelaire, P., and Wandersman, C. (1990). Protease secretion by *Erwinia chrysanthemi*: the specific secretion functions are analogous to those of *Escherichia coli* alpha-haemolysin. *EMBO J.* *9*, 1375–1382. .
- Lewis, P.J., Thaker, S.D., and Errington, J. (2000). Compartmentalization of transcription and translation in *Bacillus subtilis*. *EMBO J.* *19*, 710–718. <https://doi.org/10.1093/emboj/19.4.710>.
- Lilja, A.E., Jenssen, J.R., and Kahn, J.D. (2004). Geometric and dynamic requirements for DNA looping, wrapping and unwrapping in the activation of *E.coli* *glnAp2* transcription by NtrC. *J. Mol. Biol.* *342*, 467–478. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2004.07.057>.
- Lioy, V.S., and Boccard, F. (2018). Conformational Studies of Bacterial Chromosomes by High-Throughput Sequencing Methods. *Methods Enzymol.* *612*, 25–45. <https://doi.org/10.1016/bs.mie.2018.07.007>.
- Lioy, V.S., Lorenzi, J.-N., Najah, S., Poinsignon, T., Leh, H., Saulnier, C., Aigle, B., Lautru, S., Thibessard, A., Lespinet, O., et al. (2021). Dynamics of the compartmentalized *Streptomyces* chromosome during metabolic differentiation. *Nat. Commun.* *12*, 5221. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-25462-1>.
- Ma, J., Bai, L., and Wang, M.D. (2013). Transcription under torsion. *Science* *340*, 1580–1583. <https://doi.org/10.1126/science.1235441>.
- Mangan, M.W., Lucchini, S., Danino, V., Cróinín, T.O., Hinton, J.C.D., and Dorman, C.J. (2006). The integration host factor (IHF) integrates stationary-phase and virulence gene expression in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Mol. Microbiol.* *59*, 1831–1847. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2006.05062.x>.
- Mansfield, J., Genin, S., Magori, S., Citovsky, V., Sriariyanum, M., Ronald, P., Dow, M., Verdier, V., Beer, S.V., Machado, M.A., et al. (2012). Top 10 plant pathogenic bacteria in molecular plant pathology. *Mol. Plant Pathol.* *13*, 614–629. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2012.00804.x>.
- Marbouty, M., and Koszul, R. (2015). Metagenome Analysis Exploiting High-Throughput Chromosome Conformation Capture (3C) Data. *Trends Genet. TIG* *31*, 673–682. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2015.10.003>.
- Martis B, S., Forquet, R., Reverchon, S., Nasser, W., and Meyer, S. (2019). DNA Supercoiling: an Ancestral Regulator of Gene Expression in Pathogenic Bacteria? *Comput. Struct. Biotechnol. J.* *17*, 1047–1055. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2019.07.013>.
- Maurer, A.D., Chen, Q., McPherson, C., and Reimer, R.A. (2009). Changes in satiety hormones and expression of genes involved in glucose and lipid metabolism in rats weaned onto diets high in fibre or protein reflect susceptibility to increased fat mass in adulthood. *J. Physiol.* *587*, 679–691. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2008.161844>.
- Menzel, R., and Gellert, M. (1983). Regulation of the genes for *E. coli* DNA gyrase: homeostatic control of DNA supercoiling. *Cell* *34*, 105–113. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(83\)90140-x](https://doi.org/10.1016/0092-8674(83)90140-x).

- Menzel, R., and Gellert, M. (1987). Modulation of transcription by DNA supercoiling: a deletion analysis of the *Escherichia coli* *gyrA* and *gyrB* promoters. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *84*, 4185–4189. <https://doi.org/10.1073/pnas.84.12.4185>.
- Meyer, S., Reverchon, S., Nasser, W., and Muskhelishvili, G. (2018). Chromosomal organization of transcription: in a nutshell. *Curr. Genet.* *64*, 555–565. <https://doi.org/10.1007/s00294-017-0785-5>.
- Miller, J.G. (1972). Living systems: the organization. *Behav. Sci.* *17*, 1–82. <https://doi.org/10.1002/bs.3830170102>.
- Minton, A.P., and Wilf, J. (1981). Effect of macromolecular crowding upon the structure and function of an enzyme: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Biochemistry* *20*, 4821–4826. <https://doi.org/10.1021/bi00520a003>.
- Minton, N.P., Atkinson, T., and Sherwood, R.F. (1983). Molecular cloning of the *Pseudomonas* carboxypeptidase G2 gene and its expression in *Escherichia coli* and *Pseudomonas putida*. *J. Bacteriol.* *156*, 1222–1227. <https://doi.org/10.1128/jb.156.3.1222-1227.1983>.
- Moffitt, J.R., Pandey, S., Boettiger, A.N., Wang, S., and Zhuang, X. (2016). Spatial organization shapes the turnover of a bacterial transcriptome. *ELife* *5*. <https://doi.org/10.7554/eLife.13065>.
- Montero Llopis, P., Jackson, A.F., Sliusarenko, O., Surovtsev, I., Heinritz, J., Emonet, T., and Jacobs-Wagner, C. (2010). Spatial organization of the flow of genetic information in bacteria. *Nature* *466*, 77–81. <https://doi.org/10.1038/nature09152>.
- Mulholland, V., Hinton, J.C., Sidebotham, J., Toth, I.K., Hyman, L.J., Pérombelon, M.C., Reeves, P.J., and Salmond, G.P. (1993). A pleiotropic reduced virulence (Rvi-) mutant of *Erwinia carotovora* subspecies *atroseptica* is defective in flagella assembly proteins that are conserved in plant and animal bacterial pathogens. *Mol. Microbiol.* *9*, 343–356. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1993.tb01695.x>.
- Murakami, K.S., Masuda, S., and Darst, S.A. (2002). Structural basis of transcription initiation: RNA polymerase holoenzyme at 4 Å resolution. *Science* *296*, 1280–1284. <https://doi.org/10.1126/science.1069594>.
- Murphy, L.D., and Zimmerman, S.B. (1995). Condensation and cohesion of lambda DNA in cell extracts and other media: implications for the structure and function of DNA in prokaryotes. *Biophys. Chem.* *57*, 71–92. [https://doi.org/10.1016/0301-4622\(95\)00047-2](https://doi.org/10.1016/0301-4622(95)00047-2).
- Muskhelishvili, G., Forquet, R., Reverchon, S., Meyer, S., and Nasser, W. (2019). Coherent Domains of Transcription Coordinate Gene Expression During Bacterial Growth and Adaptation. *Microorganisms* *7*, E694. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7120694>.
- Nasser, W., and Reverchon, S. (2002). H-NS-dependent activation of pectate lyases synthesis in the phytopathogenic bacterium *Erwinia chrysanthemi* is mediated by the PecT repressor. *Mol. Microbiol.* *43*, 733–748. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2002.02782.x>.
- Nasser, W., Reverchon, S., Condemine, G., and Robert-Baudouy, J. (1994). Specific interactions of *Erwinia chrysanthemi* KdgR repressor with different operators of genes involved in pectinolysis. *J. Mol. Biol.* *236*, 427–440. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1994.1155>.

Nasser, W., Robert-Baudouy, J., and Reverchon, S. (1997). Antagonistic effect of CRP and KdgR in the transcription control of the *Erwinia chrysanthemi* pectinolysis genes. *Mol. Microbiol.* *26*, 1071–1082. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1997.6472020.x>.

Nasser, W., Faelen, M., Hugouvieux-Cotte-Pattat, N., and Reverchon, S. (2001). Role of the nucleoid-associated protein H-NS in the synthesis of virulence factors in the phytopathogenic bacterium *Erwinia chrysanthemi*. *Mol. Plant-Microbe Interact. MPMI* *14*, 10–20. <https://doi.org/10.1094/MPMI.2001.14.1.10>.

Nasser, W., Dorel, C., Wawrzyniak, J., Van Gijsegem, F., Groleau, M.-C., Déziel, E., and Reverchon, S. (2013). Vfm a new quorum sensing system controls the virulence of *Dickeya dadantii*. *Environ. Microbiol.* *15*, 865–880. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12049>.

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. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2006.05346.x>.

Nomura, K., Nasser, W., Kawagishi, H., and Tsuyumu, S. (1998). The *pir* gene of *Erwinia chrysanthemi* EC16 regulates hyperinduction of pectate lyase virulence genes in response to plant signals. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *95*, 14034–14039. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.24.14034>.

Nomura, K., Nasser, W., and Tsuyumu, S. (1999). Self-regulation of *pir*, a regulatory protein responsible for hyperinduction of pectate lyase in *Erwinia chrysanthemi* EC16. *Mol. Plant-Microbe Interact. MPMI* *12*, 385–390. <https://doi.org/10.1094/MPMI.1999.12.5.385>.

Norris, V., and Madsen, M.S. (1995). Autocatalytic gene expression occurs via transesterification and membrane domain formation and underlies differentiation in bacteria: a model. *J. Mol. Biol.* *253*, 739–748. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1995.0587>.

O Cróinín, T., Carroll, R.K., Kelly, A., and Dorman, C.J. (2006). Roles for DNA supercoiling and the Fis protein in modulating expression of virulence genes during intracellular growth of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Mol. Microbiol.* *62*, 869–882. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2006.05416.x>.

Oberto, J., Nabti, S., Jooste, V., Mignot, H., and Rouviere-Yaniv, J. (2009). The HU regulon is composed of genes responding to anaerobiosis, acid stress, high osmolarity and SOS induction. *PLoS One* *4*, e4367. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0004367>.

Ouafa, Z.-A., Reverchon, S., Lautier, T., Muskhelishvili, G., and Nasser, W. (2012). The nucleoid-associated proteins H-NS and FIS modulate the DNA supercoiling response of the *pel* genes, the major virulence factors in the plant pathogen bacterium *Dickeya dadantii*. *Nucleic Acids Res.* *40*, 4306–4319. <https://doi.org/10.1093/nar/gks014>.

Oulghazi, S., Pédrón, J., Cigna, J., Lau, Y.Y., Moumni, M., Van Gijsegem, F., Chan, K.-G., and Faure, D. (2019). *Dickeya undicola* sp. nov., a novel species for pectinolytic isolates from surface waters in Europe and Asia. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* *69*, 2440–2444. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.003497>.

Parkinson, N., DeVos, P., Pirhonen, M., and Elphinstone, J. (2014). *Dickeya aquatica* sp. nov., isolated from waterways. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* *64*, 2264–2266. <https://doi.org/10.1099/ijms.0.058693-0>.

Pissavin, C., Robert-Baudouy, J., and Hugouvieux-Cotte-Pattat, N. (1998). Biochemical characterization of the pectate lyase PelZ of *Erwinia chrysanthemi* 3937. *Biochim. Biophys. Acta* *1383*, 188–196. [https://doi.org/10.1016/s0167-4838\(97\)00191-x](https://doi.org/10.1016/s0167-4838(97)00191-x).

- Platt, R., Drescher, C., Park, S.K., and Phillips, G.J. (2000). Genetic system for reversible integration of DNA constructs and lacZ gene fusions into the Escherichia coli chromosome. *Plasmid* 43, 12–23. <https://doi.org/10.1006/plas.1999.1433>.
- Postow, L., Hardy, C.D., Arsuaga, J., and Cozzarelli, N.R. (2004). Topological domain structure of the Escherichia coli chromosome. *Genes Dev.* 18, 1766–1779. <https://doi.org/10.1101/gad.1207504>.
- Pribnow, D. (1975). Bacteriophage T7 early promoters: nucleotide sequences of two RNA polymerase binding sites. *J. Mol. Biol.* 99, 419–443. [https://doi.org/10.1016/s0022-2836\(75\)80136-7](https://doi.org/10.1016/s0022-2836(75)80136-7).
- Prieto, A.I., Kahramanoglou, C., Ali, R.M., Fraser, G.M., Seshasayee, A.S.N., and 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 Res.* 40, 3524–3537. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr1236>.
- Prigent-Combaret, C., Brombacher, E., Vidal, O., Ambert, A., Lejeune, P., Landini, P., and Dorel, C. (2001). Complex regulatory network controls initial adhesion and biofilm formation in Escherichia coli via regulation of the csgD gene. *J. Bacteriol.* 183, 7213–7223. <https://doi.org/10.1128/JB.183.24.7213-7223.2001>.
- Prigent-Combaret, C., Zghidi-Abouzid, O., Effantin, G., Lejeune, P., Reverchon, S., and Nasser, W. (2012). The nucleoid-associated protein Fis directly modulates the synthesis of cellulose, an essential component of pellicle-biofilms in the phytopathogenic bacterium Dickeya dadantii. *Mol. Microbiol.* 86, 172–186. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2012.08182.x>.
- Prosseda, G., Fradiani, P.A., Di Lorenzo, M., Falconi, M., Micheli, G., Casalino, M., Nicoletti, M., and Colonna, B. (1998). A role for H-NS in the regulation of the virF gene of Shigella and enteroinvasive Escherichia coli. *Res. Microbiol.* 149, 15–25. [https://doi.org/10.1016/s0923-2508\(97\)83619-4](https://doi.org/10.1016/s0923-2508(97)83619-4).
- Pruss, G.J., and Drlica, K. (1989). DNA supercoiling and prokaryotic transcription. *Cell* 56, 521–523. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(89\)90574-6](https://doi.org/10.1016/0092-8674(89)90574-6).
- Py, B., Bortoli-German, I., Haiech, J., Chippaux, M., and Barras, F. (1991). Cellulase EGZ of Erwinia chrysanthemi: structural organization and importance of His98 and Glu133 residues for catalysis. *Protein Eng.* 4, 325–333. <https://doi.org/10.1093/protein/4.3.325>.
- Raoul des Essarts, Y., Pédrón, J., Blin, P., Van Dijk, E., Faure, D., and Van Gijsegem, F. (2019). Common and distinctive adaptive traits expressed in Dickeya dianthicola and Dickeya solani pathogens when exploiting potato plant host. *Environ. Microbiol.* 21, 1004–1018. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.14519>.
- Remesh, S.G., Verma, S.C., Chen, J.-H., Ekman, A.A., Larabell, C.A., Adhya, S., and Hammel, M. (2020). Nucleoid remodeling during environmental adaptation is regulated by HU-dependent DNA bundling. *Nat. Commun.* 11, 2905. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-16724-5>.
- Resibois, A., Colet, M., Faelen, M., Schoonejans, E., and Toussaint, A. (1984). phiEC2, a new generalized transducing phage of Erwinia chrysanthemi. *Virology* 137, 102–112. .
- Reverchon, S., and Nasser, W. (2013). Dickeya ecology, environment sensing and regulation of virulence programme. *Environ. Microbiol. Rep.* 5, 622–636. <https://doi.org/10.1111/1758-2229.12073>.

- Reverchon, S., Nasser, W., and Robert-Baudouy, J. (1991). Characterization of *kdgR*, a gene of *Erwinia chrysanthemi* that regulates pectin degradation. *Mol. Microbiol.* *5*, 2203–2216. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1991.tb02150.x>.
- Reverchon, S., Nasser, W., and Robert-Baudouy, J. (1994). *pecS*: a locus controlling pectinase, cellulase and blue pigment production in *Erwinia chrysanthemi*. *Mol. Microbiol.* *11*, 1127–1139. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1994.tb00389.x>.
- Reverchon, S., Expert, D., Robert-Baudouy, J., and Nasser, W. (1997). The cyclic AMP receptor protein is the main activator of pectinolysis genes in *Erwinia chrysanthemi*. *J. Bacteriol.* *179*, 3500–3508. <https://doi.org/10.1128/jb.179.11.3500-3508.1997>.
- Reverchon, S., Chantegrel, B., Deshayes, C., Doutheau, A., and Cotte-Pattat, N. (2002). New synthetic analogues of N-acyl homoserine lactones as agonists or antagonists of transcriptional regulators involved in bacterial quorum sensing. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* *12*, 1153–1157. [https://doi.org/10.1016/s0960-894x\(02\)00124-5](https://doi.org/10.1016/s0960-894x(02)00124-5).
- Reverchon, S., Muskhelishvili, G., and Nasser, W. (2016). Virulence Program of a Bacterial Plant Pathogen: The *Dickeya* Model. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* *142*, 51–92. <https://doi.org/10.1016/bs.pmbts.2016.05.005>.
- Reverchon, S., Meyer, S., Forquet, R., Hommais, F., Muskhelishvili, G., and Nasser, W. (2021). The nucleoid-associated protein IHF acts as a “transcriptional domainin” protein coordinating the bacterial virulence traits with global transcription. *Nucleic Acids Res.* *49*, 776–790. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa1227>.
- Rimsky, S., and Travers, A. (2011). Pervasive regulation of nucleoid structure and function by nucleoid-associated proteins. *Curr. Opin. Microbiol.* *14*, 136–141. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2011.01.003>.
- Ross, W., Thompson, J.F., Newlands, J.T., and Gourse, R.L. (1990). *E. coli* Fis protein activates ribosomal RNA transcription in vitro and in vivo. *EMBO J.* *9*, 3733–3742. .
- Rui, S., and Tse-Dinh, Y.-C. (2003). Topoisomerase function during bacterial responses to environmental challenge. *Front. Biosci. J. Virtual Libr.* *8*, d256-263. <https://doi.org/10.2741/984>.
- Sambrook, J., and Russell, D.W. (2006). Preparation and Transformation of Competent *E. coli* Using Calcium Chloride. *CSH Protoc.* *2006*, pdb.prot3932. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot3932>.
- Samson, R., Legendre, J.B., Christen, R., Saux, M.F.-L., Achouak, W., and Gardan, L. (2005). Transfer of *Pectobacterium chrysanthemi* (Burkholder et al. 1953) Brenner et al. 1973 and *Brenneria paradisiaca* to the genus *Dickeya* gen. nov. as *Dickeya chrysanthemi* comb. nov. and *Dickeya paradisiaca* comb. nov. and delineation of four novel species, *Dickeya dadantii* sp. nov., *Dickeya dianthicola* sp. nov., *Dickeya dieffenbachiae* sp. nov. and *Dickeya zeae* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* *55*, 1415–1427. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.02791-0>.
- Sánchez-Romero, M.-A., Lee, D.J., Sánchez-Morán, E., and Busby, S.J.W. (2012). Location and dynamics of an active promoter in *Escherichia coli* K-12. *Biochem. J.* *441*, 481–485. <https://doi.org/10.1042/BJ20111258>.
- Sanderson, A., Mitchell, J.E., Minchin, S.D., and Busby, S.J.W. (2003). Substitutions in the *Escherichia coli* RNA polymerase sigma70 factor that affect recognition of extended -10 elements at promoters. *FEBS Lett.* *544*, 199–205. [https://doi.org/10.1016/s0014-5793\(03\)00500-3](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(03)00500-3).

- Schechter, L.M., Jain, S., Akbar, S., and Lee, C.A. (2003). The small nucleoid-binding proteins H-NS, HU, and Fis affect hilA expression in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Infect. Immun.* *71*, 5432–5435. <https://doi.org/10.1128/IAI.71.9.5432-5435.2003>.
- Schmitt, M.E., Brown, T.A., and Trumppower, B.L. (1990). A rapid and simple method for preparation of RNA from *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res.* *18*, 3091–3092. <https://doi.org/10.1093/nar/18.10.3091>.
- Schneider, R., Travers, A., and Muskhelishvili, G. (1997). FIS modulates growth phase-dependent topological transitions of DNA in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* *26*, 519–530. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1997.5951971.x>.
- Schneider, R., Travers, A., Kutateladze, T., and Muskhelishvili, G. (1999). A DNA architectural protein couples cellular physiology and DNA topology in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* *34*, 953–964. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1999.01656.x>.
- Schröder, O., and Wagner, R. (2002). The bacterial regulatory protein H-NS--a versatile modulator of nucleic acid structures. *Biol. Chem.* *383*, 945–960. <https://doi.org/10.1515/BC.2002.101>.
- Scolari, V.F., Bassetti, B., Sclavi, B., and Lagomarsino, M.C. (2011). Gene clusters reflecting macrodomain structure respond to nucleoid perturbations. *Mol. Biosyst.* *7*, 878–888. <https://doi.org/10.1039/c0mb00213e>.
- Sepulchre, J.-A., Reverchon, S., and Nasser, W. (2007). Modeling the onset of virulence in a pectinolytic bacterium. *J. Theor. Biol.* *244*, 239–257. <https://doi.org/10.1016/j.jtbi.2006.08.010>.
- Sepulchre, J.-A., Reverchon, S., Gouzé, J.-L., and Nasser, W. (2019). Modeling the bioconversion of polysaccharides in a continuous reactor: A case study of the production of oligogalacturonates by *Dickeya dadantii*. *J. Biol. Chem.* *294*, 1753–1762. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.004615>.
- Shen, B.A., and Landick, R. (2019). Transcription of Bacterial Chromatin. *J. Mol. Biol.* *431*, 4040–4066. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2019.05.041>.
- Sheridan, S.D., Benham, C.J., and Hatfield, G.W. (1998). Activation of gene expression by a novel DNA structural transmission mechanism that requires supercoiling-induced DNA duplex destabilization in an upstream activating sequence. *J. Biol. Chem.* *273*, 21298–21308. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.33.21298>.
- Shevchik, V.E., and Hugouvieux-Cotte-Pattat, N. (1997). Identification of a bacterial pectin acetyl esterase in *Erwinia chrysanthemi* 3937. *Mol. Microbiol.* *24*, 1285–1301. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1997.4331800.x>.
- Snoep, J.L., van der Weijden, C.C., Andersen, H.W., Westerhoff, H.V., and Jensen, P.R. (2002). DNA supercoiling in *Escherichia coli* is under tight and subtle homeostatic control, involving gene-expression and metabolic regulation of both topoisomerase I and DNA gyrase. *Eur. J. Biochem.* *269*, 1662–1669. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.2002.02803.x>.
- Sobetzko, P., Travers, A., and Muskhelishvili, G. (2012). Gene order and chromosome dynamics coordinate spatiotemporal gene expression during the bacterial growth cycle. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *109*, E42–50. <https://doi.org/10.1073/pnas.1108229109>.

Sobetzko, P., Glinkowska, M., Travers, A., and Muskhelishvili, G. (2013). DNA thermodynamic stability and supercoil dynamics determine the gene expression program during the bacterial growth cycle. *Mol. Biosyst.* *9*, 1643–1651. <https://doi.org/10.1039/C3MB25515H>.

Song, D., and Loparo, J.J. (2015). Building bridges within the bacterial chromosome. *Trends Genet. TIG* *31*, 164–173. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2015.01.003>.

Stonehouse, E., Kovacikova, G., Taylor, R.K., and Skorupski, K. (2008). Integration host factor positively regulates virulence gene expression in *Vibrio cholerae*. *J. Bacteriol.* *190*, 4736–4748. <https://doi.org/10.1128/JB.00089-08>.

Stracy, M., Lesterlin, C., Garza de Leon, F., Uphoff, S., Zawadzki, P., and Kapanidis, A.N. (2015). Live-cell superresolution microscopy reveals the organization of RNA polymerase in the bacterial nucleoid. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *112*, E4390-4399. <https://doi.org/10.1073/pnas.1507592112>.

Tani, T.H., Khodursky, A., Blumenthal, R.M., Brown, P.O., and Matthews, R.G. (2002). Adaptation to famine: a family of stationary-phase genes revealed by microarray analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *99*, 13471–13476. <https://doi.org/10.1073/pnas.212510999>.

Tas, H., Nguyen, C.T., Patel, R., Kim, N.H., and Kuhlman, T.E. (2015). An Integrated System for Precise Genome Modification in *Escherichia coli*. *PLoS One* *10*, e0136963. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0136963>.

.Tiana, G., and Giorgetti, L. (2018). Integrating experiment, theory and simulation to determine the structure and dynamics of mammalian chromosomes. *Curr. Opin. Struct. Biol.* *49*, 11–17. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2017.10.016>.

Tomsic, M., Tsujikawa, L., Panaghie, G., Wang, Y., Azok, J., and deHaset, P.L. (2001). Different roles for basic and aromatic amino acids in conserved region 2 of *Escherichia coli* sigma(70) in the nucleation and maintenance of the single-stranded DNA bubble in open RNA polymerase-promoter complexes. *J. Biol. Chem.* *276*, 31891–31896. <https://doi.org/10.1074/jbc.M105027200>.

Toth, I.K., van der Wolf, J.M., Saddler, G., Lojkowska, E., Hélias, V., Pirhonen, M., Tsrer Lahkim, L., and Elphinstone, J.G. (2011). *Dickeya* species: an emerging problem for potato production in Europe: *Dickeya* spp. on potato in Europe. *Plant Pathol.* *60*, 385–399. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2011.02427.x>.

Tran, C.N., Giangrossi, M., Prosseda, G., Brandi, A., Di Martino, M.L., Colonna, B., and Falconi, M. (2011). A multifactor regulatory circuit involving H-NS, VirF and an antisense RNA modulates transcription of the virulence gene *icsA* of *Shigella flexneri*. *Nucleic Acids Res.* *39*, 8122–8134. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr521>.

Travers, A., and Muskhelishvili, G. (2005). DNA supercoiling - a global transcriptional regulator for enterobacterial growth? *Nat. Rev. Microbiol.* *3*, 157–169. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1088>.

Trussart, M., Yus, E., Martinez, S., Baù, D., Tahara, Y.O., Pengo, T., Widjaja, M., Kretschmer, S., Swoger, J., Djordjevic, S., et al. (2017). Defined chromosome structure in the genome-reduced bacterium *Mycoplasma pneumoniae*. *Nat. Commun.* *8*, 14665. <https://doi.org/10.1038/ncomms14665>.

Tse-Dinh, Y.C. (1985). Regulation of the *Escherichia coli* DNA topoisomerase I gene by DNA supercoiling. *Nucleic Acids Res.* *13*, 4751–4763. <https://doi.org/10.1093/nar/13.13.4751>.

- Tse-Dinh, Y.C., and Beran-Steed, R.K. (1988). Escherichia coli DNA topoisomerase I is a zinc metalloprotein with three repetitive zinc-binding domains. *J. Biol. Chem.* *263*, 15857–15859. .
- Tsujikawa, L., Tsodikov, O.V., and deHaseth, P.L. (2002). Interaction of RNA polymerase with forked DNA: evidence for two kinetically significant intermediates on the pathway to the final complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *99*, 3493–3498. <https://doi.org/10.1073/pnas.062487299>.
- Umbarger, M.A., Toro, E., Wright, M.A., Porreca, G.J., Baù, D., Hong, S.-H., Fero, M.J., Zhu, L.J., Marti-Renom, M.A., McAdams, H.H., et al. (2011). The three-dimensional architecture of a bacterial genome and its alteration by genetic perturbation. *Mol. Cell* *44*, 252–264. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2011.09.010>.
- van der Valk, R.A., Vreede, J., Qin, L., Moolenaar, G.F., Hofmann, A., Goosen, N., and Dame, R.T. (2017). Mechanism of environmentally driven conformational changes that modulate H-NS DNA-bridging activity. *ELife* *6*, e27369. <https://doi.org/10.7554/eLife.27369>.
- Valkenburg, J.A., Woldringh, C.L., Brakenhoff, G.J., van der Voort, H.T., and Nanninga, N. (1985). Confocal scanning light microscopy of the Escherichia coli nucleoid: comparison with phase-contrast and electron microscope images. *J. Bacteriol.* *161*, 478–483. <https://doi.org/10.1128/jb.161.2.478-483.1985>.
- Vallet-Gely, I., and Boccard, F. (2013). Chromosomal organization and segregation in *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS Genet.* *9*, e1003492. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003492>.
- Viollier, P.H., Thanbichler, M., McGrath, P.T., West, L., Meewan, M., McAdams, H.H., and Shapiro, L. (2004). Rapid and sequential movement of individual chromosomal loci to specific subcellular locations during bacterial DNA replication. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *101*, 9257–9262. <https://doi.org/10.1073/pnas.0402606101>.
- Wang, J.C. (1971). Interaction between DNA and an Escherichia coli protein omega. *J. Mol. Biol.* *55*, 523–533. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(71\)90334-2](https://doi.org/10.1016/0022-2836(71)90334-2).
- Wang, M., and Lai, E. (1995). Pulsed field separation of large supercoiled and open-circular DNAs and its application to bacterial artificial chromosome cloning. *Electrophoresis* *16*, 1–7. <https://doi.org/10.1002/elps.1150160102>.
- Wang, Z., and Dröge, P. (1996). Differential control of transcription-induced and overall DNA supercoiling by eukaryotic topoisomerases in vitro. *EMBO J.* *15*, 581–589. .
- Wang, X., Montero Llopis, P., and Rudner, D.Z. (2013). Organization and segregation of bacterial chromosomes. *Nat. Rev. Genet.* *14*, 191–203. <https://doi.org/10.1038/nrg3375>.
- Wang, X., He, S.-W., Guo, H.-B., Han, J.-G., Thin, K.K., Gao, J.-S., Wang, Y., and Zhang, X.-X. (2020). *Dickeya oryzae* sp. nov., isolated from the roots of rice. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* *70*, 4171–4178. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004265>.
- Watson, J.D., and Crick, F.H. (1953). Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature* *171*, 737–738. <https://doi.org/10.1038/171737a0>.
- Weinstein-Fischer, D., Elgrably-Weiss, M., and Altuvia, S. (2000). Escherichia coli response to hydrogen peroxide: a role for DNA supercoiling, topoisomerase I and Fis. *Mol. Microbiol.* *35*, 1413–1420. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2000.01805.x>.

Weng, X., Bohrer, C.H., Bettridge, K., Lagda, A.C., Cagliero, C., Jin, D.J., and Xiao, J. (2019). Spatial organization of RNA polymerase and its relationship with transcription in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *116*, 20115–20123. <https://doi.org/10.1073/pnas.1903968116>.

Westerhoff, H.V., O’Dea, M.H., Maxwell, A., and Gellert, M. (1988). DNA supercoiling by DNA gyrase. A static head analysis. *Cell Biophys.* *12*, 157–181. <https://doi.org/10.1007/BF02918357>.

Wiggins, P.A., Cheveralls, K.C., Martin, J.S., Lintner, R., and Kondev, J. (2010). Strong intranucleoid interactions organize the *Escherichia coli* chromosome into a nucleoid filament. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *107*, 4991–4995. <https://doi.org/10.1073/pnas.0912062107>.

Winslow, C.E., Broadhurst, J., Buchanan, R.E., Krumwiede, C., Rogers, L.A., and Smith, G.H. (1920). The Families and Genera of the Bacteria: Final Report of the Committee of the Society of American Bacteriologists on Characterization and Classification of Bacterial Types. *J. Bacteriol.* *5*, 191–229. <https://doi.org/10.1128/jb.5.3.191-229.1920>.

Woldringh, C.L. (2002). The role of co-transcriptional translation and protein translocation (transertion) in bacterial chromosome segregation. *Mol. Microbiol.* *45*, 17–29. .

Woodcock, D.M., Crowther, P.J., Doherty, J., Jefferson, S., DeCruz, E., Noyer-Weidner, M., Smith, S.S., Michael, M.Z., and Graham, M.W. (1989). Quantitative evaluation of *Escherichia coli* host strains for tolerance to cytosine methylation in plasmid and phage recombinants. *Nucleic Acids Res.* *17*, 3469–3478. <https://doi.org/10.1093/nar/17.9.3469>.

Worcel, A., and Burgi, E. (1972). On the structure of the folded chromosome of *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* *71*, 127–147. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(72\)90342-7](https://doi.org/10.1016/0022-2836(72)90342-7).

Wösten, M.M. (1998). Eubacterial sigma-factors. *FEMS Microbiol. Rev.* *22*, 127–150. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.1998.tb00364.x>.

Wray, N.R., Ripke, S., Mattheisen, M., Trzaskowski, M., Byrne, E.M., Abdellaoui, A., Adams, M.J., Agerbo, E., Air, T.M., Andlauer, T.M.F., et al. (2018). Genome-wide association analyses identify 44 risk variants and refine the genetic architecture of major depression. *Nat. Genet.* *50*, 668–681. <https://doi.org/10.1038/s41588-018-0090-3>.

Xin, X.-F., Kvitko, B., and He, S.Y. (2018). *Pseudomonas syringae*: what it takes to be a pathogen. *Nat. Rev. Microbiol.* <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2018.17>.

Zechiedrich, E.L., Khodursky, A.B., and Cozzarelli, N.R. (1997). Topoisomerase IV, not gyrase, decatenates products of site-specific recombination in *Escherichia coli*. *Genes Dev.* *11*, 2580–2592. <https://doi.org/10.1101/gad.11.19.2580>.

Zechiedrich, E.L., Khodursky, A.B., Bachellier, S., Schneider, R., Chen, D., Lilley, D.M., and Cozzarelli, N.R. (2000). Roles of topoisomerases in maintaining steady-state DNA supercoiling in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* *275*, 8103–8113. <https://doi.org/10.1074/jbc.275.11.8103>.

Zhang, J., and Landick, R. (2016). A Two-Way Street: Regulatory Interplay between RNA Polymerase and Nascent RNA Structure. *Trends Biochem. Sci.* *41*, 293–310. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2015.12.009>.

Zhao, X., Shahul Hameed, U.F., Kharchenko, V., Liao, C., Huser, F., Remington, J.M., Radhakrishnan, A.K., Jaremko, M., Jaremko, Ł., Arold, S.T., et al. (2021). Molecular basis for the adaptive evolution of environment-sensing by H-NS proteins. *ELife* *10*, e57467. <https://doi.org/10.7554/eLife.57467>.

Zhou, M.Y., and Gomez-Sanchez, C.E. (2000). Universal TA cloning. *Curr. Issues Mol. Biol.* 2, 1–7. .

Zimmerman, S.B., and Minton, A.P. (1993). Macromolecular crowding: biochemical, biophysical, and physiological consequences. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 22, 27–65.
<https://doi.org/10.1146/annurev.bb.22.060193.000331>.

Zimmerman, S.B., and Trach, S.O. (1991). Estimation of macromolecule concentrations and excluded volume effects for the cytoplasm of *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* 222, 599–620.
[https://doi.org/10.1016/0022-2836\(91\)90499-v](https://doi.org/10.1016/0022-2836(91)90499-v).

