



Université
de Toulouse

THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par

Université Toulouse 3 Paul Sabatier (UT3 Paul Sabatier)

Discipline ou spécialité :

Microbiologie et Génétique Moléculaires

Présentée et soutenue par

Mathieu Stouf

Le 27 septembre 2013, 13h30

Titre :

Etude de la ségrégation de la région Terminale du chromosome d'Escherichia coli

JURY

Pr. C. GUTIERREZ , Professeur, UPS, Toulouse

Dr. O. ESPELI, Directeur de Recherche, CGM, Gif-sur-Yvette

Dr. C. GRANGEASSE, Directeur de Recherche, IBCP, Lyon

Pr. X. De BOLLE, Professeur, URBM, Namure

Dr. F. CORNET, Directeur de recherche, LMGM, Toulouse

Ecole doctorale : *Biologie-Santé-Biotechnologies, Toulouse*

Unité de recherche : *Laboratoire de Microbiologie et génétique moléculaires, UMR5100 CNRS-UPS*

Directeur(s) de Thèse : *Dr. F. CORNET, LMGM, Toulouse*

Rapporteurs : *Dr. O. ESPELI, Directeur de Recherche, CGM, Gif-sur-Yvette*

Dr. C. GRANGEASSE, Directeur de Recherche, IBCP, Lyon

REMERCIEMENTS

Mon parcours scolaire a été assez chaotique. Si à la base, je souhaitais être pâtissier au collège, puis garde forestier au lycée, j'ai finalement décidé, après avoir subi l'ignominie d'une année de CPGE, d'orienter mon cursus vers l'université et plus précisément vers la microbiologie et jamais je n'ai eu de regrets au cours de mes années d'études supérieures. J'aime ce que je fais actuellement (pas le chômage, certes), je n'ai pas de remords quant à mon choix de sujets de thèse et de l'endroit où j'ai passé ces 6 dernières années : j'ai eu la possibilité de faire ce que je voulais faire et je remercie donc toutes les personnes qui m'ont aidées à prendre les décisions qui font ce que je suis aujourd'hui et qui ont été patientes avec mes choix : Papa, Maman, Merci.

Avant tout, je tiens à remercier de manière générale, toutes les personnes de l'équipe qui m'ont supporté tout au long de ces quatre années de thèse : je sais qu'à certains moments, soit armé d'un Nerf et collé à une porte pour surprendre, soit en jurant soudainement à la paillasse « nom de Dieu de putain de bordel de merde de saloperie de connard d'enculé de ta mère », soit en jouant l'autiste avec un casque insonorisé aussi gros que ma tête, je suis passé pour une personne qu'on n'a pas forcément envie de contrarier et qui pourrait se retrouver sous la rubrique fait divers, catégorie coupeur de tête avec un sabre japonais. Alors qu'en fait, je n'ai jamais aimé couper des humains... Pour tout cela, je tiens à m'excuser de la détresse que je lisais dans votre regard suite à l'une de ces crises, je crois que je suis guéri maintenant.

Je remercie François pour son encadrement et l'aide qu'il m'a apportée dans la compréhension du cycle cellulaire bactérien. Il a su faire preuve d'une très grande patience concernant ma psychorigidité pour certaines problématiques, et je le remercie vraiment pour cela. François m'a enseigné la rigueur scientifique et m'a appris à se poser des questions simples : quand on a l'habitude de prendre le chemin le plus long et complexe pour répondre à un problème, on a vraiment tendance à se sentir idiot et petit auprès d'une personne comme François ...

Je tiens à remercier JC (in JC we trust) qui m'a encadré au cours de mon Master et en début de thèse. Il m'a guidé à la paillasse, m'a appris à me servir d'un microscope à fluorescence et m'a enseigné comment descendre une bouteille de Calva en moins de temps qu'il n'en faut pour descendre une pinte de bière.

Si Philippe ne m'a pas encadré à la paillasse, sa bonne humeur (sauf le « Tais-toi » compulsif en cas de pris de conscience que la deadline, ... c'est aujourd'hui) et son humour m'ont permis de passer de très bons moments au bureau et en soirée. Il m'a aussi accompagné pour un concert Punk Électro Juvénile inoubliable, et je dois dire que c'était bien sympa.

Je tiens à dire que j'ai été impressionné par le stoïcisme des filles de l'équipe après certaines blagues sortis de ma bouche, de celle de Philou, ou des contrepèteries de François. Je tiens ainsi à m'excuser auprès d'elles pour la lourdeur de certains moments. J'ai passé un très bon moment à vos côtés et, je vous remercie : Elise, pour ta bonne humeur et décontraction en soirée, surtout en mode « mince, j'ai encore eu un verre gratuit », Maïa, pour tes remarques façon « cadavre exquis » (certaines resteront dans ma mémoire un moment), Caroline et Estelle qui ont toujours su ramener la conversation terre à terre, Carine pour son humour bordelais et ses connaissances expérimentales, Luu pour sa générosité sans limite et enfin Sophie, partie peu de temps après le début de ma thèse qui rien qu'avec un regard m'a appris qu'on pouvait faire taire une personne. Merci.

Sans oublier non plus, la personne qui a elle seule a permis de faire passer la moyenne de taille des hommes de l'équipe au-dessus de celle des femmes, Cheik qui sera certainement nommé Ministre de l'Enseignement du Sénégal d'ici 5 ans. Et Florian qui a commencé son pèlerinage dans l'équipe et qui est, contre son gré, devenue le pâtissier de l'équipe, R.I.P.

Je garde de très bon souvenir des personnes que j'ai rencontrées au cours de mon passage à l'IBCG. Notamment Benjamin et Mathieu, qui, à jeun ou saoul, font preuve d'une ingéniosité sans limite pour faire rire et suer les gens (parfois en même temps). J'ai beaucoup appris à leurs côtés, comme comment tordre le rotor d'une centrifugeuse et accuser le stagiaire tout en restant inébranlable et impassible, ou encore comment faire le « Brouillard Béarnais » et réguler son hyperactivité en criant dans les couloirs, tout en jouant à l'homme jokari. Respect. Je remercie aussi leurs femmes Vanessa et Élodie qui, il faut le dire, ont vraiment su faire preuve de courage pour les ramener à la raison et avec qui j'ai passé de bons moments aussi.

Je n'oublie pas non plus Natalie et Jérôme qui ont toujours été disponibles en cas de problème à la microscopie ou pour discuter dans les couloirs du bâtiment, Caroline qui, derrière son charriot, est toujours souriante, Calum, qui a essayé de m'incruster dans sa confrérie du Poker, JY pour m'avoir montré comment présenter son poster à un Japonais saoul, Aurore, Violette, Anne Lyse, et bien d'autres pour leur bonne humeur, Bernard, pour son déphasage journalier, Nicolas, en mode Gilbert déguisé ou pas, Ambre pour ses corrections sur mon utilisation des « a », « au » et « en » en état d'ébriété; Marie Pierre et Patricia pour me demander ce que je faisais là, et aussi ceux qui nous ont quittés en cours de ma thèse, Kounthea pour m'avoir permis de participer la grande histoire qu'est Alpha-T jusqu'à ce que le bateau sombre dans les abysses, spéciale dédicace à l'école doctorale à ce niveau-là, chapeau, JP, à ne pas confondre avec IP Man, même s'il aurait pu jouer le rôle, Christian pour m'avoir aidé à me servir de nombreux outils et fait découvrir Oxford, ainsi que sa petite famille, et bien d'autres ...

Si deux factions s'opposent à l'Ibcg, je tiens à remercier certains levuristes comme Olivier qui m'a pris dans son équipe en M1 et les deux Christophe pour leur bizutage verbal et physique, et pour m'avoir appris l'impact de l'utilisation d'un réglet qui claque sur une paillasse pour mimer un arc électrique sur le moral d'un stagiaire. J'ai également apprécié certaines discussions éclectiques avec Richard en fin de soirée (s'en souvient-il ?), avec Hicham sur la guerre des cailloux au Liban et avec Sylvain autour d'un verre. Je remercie aussi Émilie, Ismaël, Marie, Sandra, Clément, Yvan, Anthony, Bertrand, Clément, qui sont tous des personnes avec qui j'ai passé de très bons moments en soirée ou lors de sorties pédestres dans les rues de Toulouse, et à ceux que j'ai oubliés, volontairement ou non.

Enfin, je tiens à remercier mes amis qui m'accompagnent depuis le M1 et avec qui j'ai fabriqué de nombreux souvenirs. Alex qui, s'il continue à bucher autant en journée et sortir autant le soir, va finir par mourir de vieillesse à 30 ans (alors qu'on dirait qu'il en a 15, mais ça c'est parce qu'il est imberbe et de petite taille), Marie, toujours la tête entre deux cuves de vin, Yoann qui a décidé de changer radicalement de voie afin de tester enfin si les robes d'infirmière peuvent lui aller et Édouard dont on s'interroge toujours sur son orientation sexuelle quand il se perd dans la boisson...

A tous, ... Merci

SOMMAIRE

Abréviations	3
I-Introduction	5
1-Compaction des chromosomes en nucléoïde	7
1.1-Domains topologiques, topologie et SMC	9
1.2-Structures des nucléoïdes	11
1.3-Macro-Domaine	15
1.4-Conformation des nucléoïdes.....	17
1.5-Occupation de l'espace cellulaire hors du nucléoïde	19
1.6-Physique du nucléoïde	21
2-Cycle cellulaire	25
2.1-Périodes BCD.....	25
2.2-Réplication des chromosomes.....	29
2.2.1-Initiation et Terminaison de la réplication	29
2.2.2-Dynamique spatio temporelle des réplisomes bactériens	33
2.2.3-Perturbations topologiques au cours de la réplication	35
2.2.4-Dimères de chromosomes	37
2.3-Cohésion post-réplivative.....	37
2.3.1-Différentes mesures de la cohésion.....	39
2.3.2-Acteurs et modèle actuel	39
2.4-Ségrégation des chromosomes.....	40
2.4.1-Ségrégation du chromosome d' <i>E. coli</i>	41
2.4.2-Modèles de ségrégations des chromosomes chez <i>E. coli</i>	45
2.4.3-Les systèmes Par chromosomiques.....	49
2.4.4-Organisation et ségrégation des chromosomes chez d'autres bactéries.....	52
2.5-Discussion sur la Ségrégation des chromosomes.....	55
3-Architecture et dynamique de la région Ter	57
3.1-Introduction historique.....	57
3.1.1-Qu'y a-t-il à la « fin » ?.....	57
3.1.3-Polarisation et propriétés de la région Terminale	59
3.1.4-Recombinaison XerCD/ <i>dif</i>	61
3.2-Longer, bigger, faster, stronger ; FtsK.....	63
3.2.1-Bigger, longer : structure et interaction.	65
3.2.2-Faster, stronger ; polarité, translocation et dynamique	67
3.2.2.1-Reconnaissance de séquences biaisées	67
3.2.2.2-Mécanisme de translocation.....	69
3.2.2.3-Dynamique de FtsK	69
3.3-Septation et régulation de la formation du septum	71
3.4-Organisation et dynamique de Ter	73
II-Résultats Préliminaires et Objectifs de Thèse	79
III-Résultats	85
1-Résultats préliminaires de Thèse et Méthodes	87
1.1-Comment localiser un <i>locus</i> chromosomique ?	89
1.2-Principe du système de recombinaison homologue utilisé	91
1.3-Analyse en microscopie à fluorescence et principe.	92
2-FtsK ségrège activement la région Terminale	95
2.1-Constructions de Système ParB/ <i>parS</i> sans cohésion supplémentaire induite.....	95

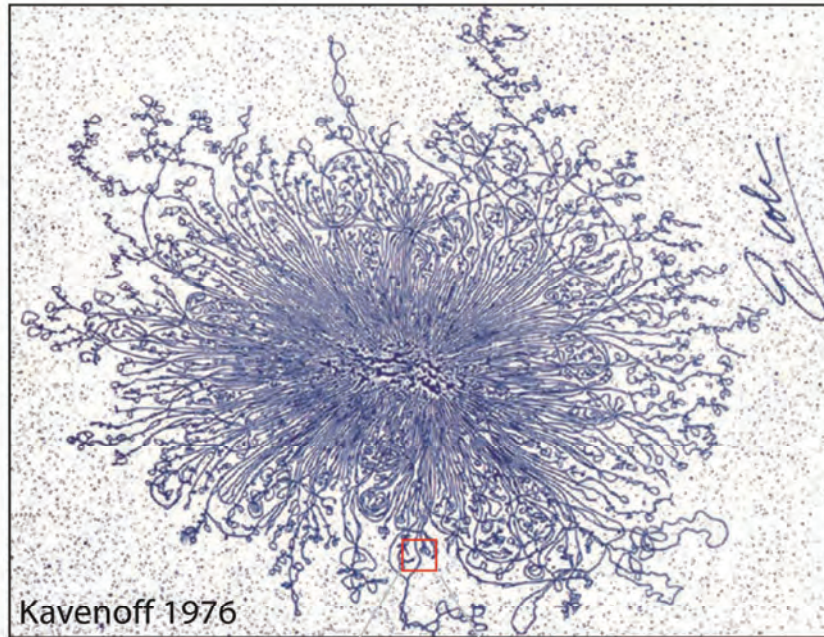
2.2-Analyse des paramètres du cycle cellulaire.....	97
2.3-Publication	99
2.4-Discussion et modèle	102
2.5-Résultats complémentaires.....	105
2.5.1-Analyse du phénotype réplcatif et divisionnel en KOPSb.....	107
2.5.2-FtsK sépare la Ségrégation de la FHAR du reste du chromosome.....	109
2.5.3-L'orientation de l'activité de FtsK affecte la co-localisation de la FHAR avec le reste du chromosome.....	111
2.5.4-L'orientation de l'activité de FtsK ne modifie pas l'organisation du MD Ter111	
3-La dynamique de la région Ter contrôle la fin du cycle cellulaire.	114
3.1-MatP est requis pour la restriction de l'activité de FtsK dans la FHAR.....	116
3.2-Le positionnement des <i>loci</i> en dehors de la FHAR est altéré quand la région Terminale n'est plus organisée.....	118
3.3-Mobilité des <i>loci</i> quand la région Terminale n'est plus condensée.....	120
3.4-Rôle du timing de formation du septum de division dans la dynamique de la région Terminale.	124
3.5-Organisation de la région Terminale au centre de la cellule.....	124
Conclusion et Perspectives.....	126
IV-Discussion générale : perspectives et questions ouvertes.	132
1-FtsK ségrége de manière ordonnée et progressive la région Terminale.	135
1.1-Discussion des résultats	135
1.2-Hypothèse sur les forces à l'origine de la ségrégation de la région Terminale	137
1.3-Perspectives expérimentales	138
2- La dynamique de la région Terminale contrôle la fin du cycle cellulaire.	139
3-Cohésion et Topologie Terminale	141
V-Références	144
VI-Annexes	160
Annexe I	162
Annexe II	164

Abréviations

ADN = Acide Désoxyribonucléique
ara = arabinose
ATP = Adénosine Triphosphate
Cfp = Cyan fluorescent protein
Cm = Chloramphénicol
CSA = Casamino Acids
dif = deletion induce filamentation
DO = Densité Optique
FHAR = FtsK High Activity Region
FISH = Fluorescent In Situ Hybridization
FRAP = Fluorescence Recovery After Photobleaching
FROS = Fluorescent Repressor Operator System
Gfp = Green Fluorescent Protein
Gm = Gentamycin
IHF = Integration Host Factor
IPTG = Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside
Kb = Kilo bases
Kn = Kanamycine
KOPS = FtsK Orienting Polarized Sequence
lac = lactose
MD = Macro Domaine
nt = nucléotide
NS-L = Non Structurée - Gauche
NS-R = Non Structurée - Droite
PALM = Photo-Activated Localization Microscopy
Pb = Paire de bases
PCR = Réaction de polymérisation en chaine
SBS = SlmA Binding Site
SRS = SpoIIIE Recognition Sequences
St = Streptomycine
Topo = Topoisomérase
wt = contexte sauvage
Yfp = Yellow fluorescent protein

I-Introduction

A)



B)

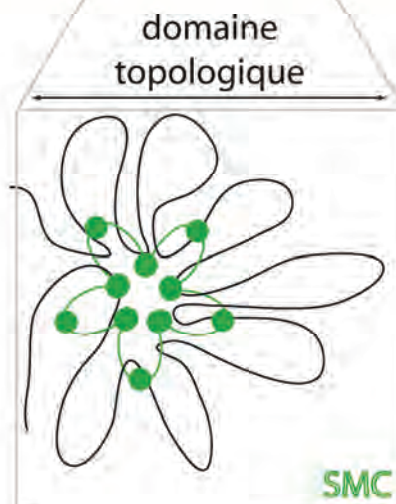


Figure 1 - Rosette et domaine topologique

(A) Nucléotide représenté en microscopie électronique. Le nucléoïde est décondensé en périphérie. On remarque la présence de sous-domaines bouclés en périphérie. **(B)** Un domaine topologique est représenté avec un complexe SMC qui maintiendrait la structure du domaine topologique.

1-Compaction des chromosomes en nucléoïde

L'image de l'organisation de l'ADN complexé en un nucléoïde est simple à imaginer si on s'arrête aux images de Rosette d'ADN en microscopie électronique (**Kavenoff and Ryder 1976**), mais l'explication du maintien d'une telle structure hyper-condensée dans un espace confiné est toujours complexe à décrire (**Figure 1A**). Sachant que la taille des génomes procaryotes varie de 200kb à 13Mb et la longueur des cellules de 0,2 μ M à 750 μ M, il existe différents niveaux de compaction d'une espèce bactérienne à l'autre. Par exemple comparé à *E. coli*, le nucléoïde de *Beggiatoa* a 10⁶ fois plus d'espace pour s'organiser (**Rocha 2008**).

L'ADN est chargé négativement, et s'enroule en supertours négatifs sous forme de contraintes topologiques. Ces contraintes organisent l'ADN en un nucléoïde « primaire ». Cette organisation est maintenue « secondairement » par des acteurs responsables des variations de l'état de condensation. Le nucléoïde est organisé en différents niveaux : de la présence de domaines topologiques qui forment une unité de base de l'organisation de l'ADN en supertour négatif (10 à 100kb) et à un niveau plus large, via une organisation en Macro Domaines (**Figure 1A**).

Dans cette première partie introductive, je décris les différents acteurs dans l'organisation du chromosome en un nucléoïde. Je présente l'organisation de l'ADN en domaines topologiques puis, les rôles des protéines associées au nucléoïde. J'introduis ensuite la notion de Macro Domaine et je termine cette partie par une description physique de l'organisation du nucléoïde.

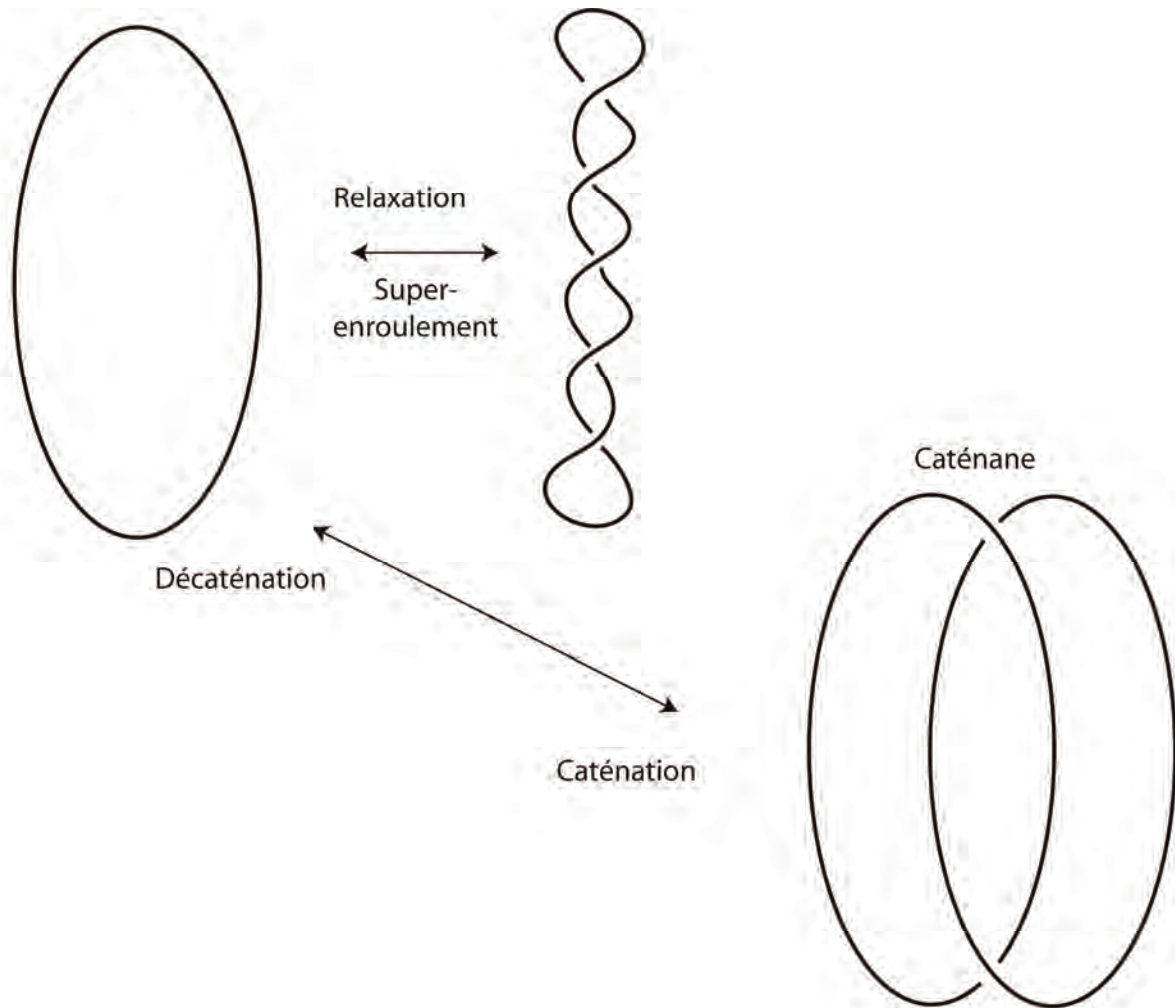


Figure 2 - Réactions des topoisomérases de type II

Représentation des différentes activités des topoisomérases de Type II comme la Gyrase et la Topoisomérase IV. Les changements de relaxation et super-enroulement de l'ADN interviennent au cours de la réplication. Ils sont menés principalement par la Gyrase. La résolution des pré-caténanes et caténanes intervient durant la période post-réplivative par la Topoisomérase IV.

1.1-Domains topologiques et SMC

La double hélice de l'ADN s'enroule naturellement sur elle-même, en fonction de la contrainte topologique présente. La topologie conduit à la formation de boucles. Ces boucles se regroupent entre elles comme les pétales d'une fleur et leur confèrent une certaine stabilité (**Figure 1B**). Cet enroulement est le principal mécanisme de compaction de l'ADN. Cet enroulement est différent de chez les eucaryotes puisque les chromosomes procaryotes ne disposent pas d'extrémités libres et sont majoritairement circulaires. Cette organisation condensée du chromosome en « fleur », correspond aux « domaines topologiques », et a été caractérisée après l'observation de nucléoïdes isolés en microscopie électronique (**Kavenoff and Bowen 1976, Kavenoff and Ryder 1976**). La taille des domaines topologiques est estimée de 10kb à 100kb, et correspond au nombre de coupures nécessaires pour relâcher complètement l'enroulement négatif du chromosome (**Worcel and Burgi, 1972, Sinden and Pettijohn 1981**). En cas d'une coupure (simple ou double brins) dans une des boucles d'un domaine topologique, la relaxation de l'ADN est limitée à ce domaine, et ne se propage pas sur tout le chromosome. La taille de ces domaines serait plus proche de 10kb que de 100kb, suggérant la présence d'au moins 400 domaines topologiques chez *E coli* (**Postow 2004**). Les domaines topologiques protègent le chromosome de la relaxation, ils jouent un rôle dans la décaténation des liens entre copies chromosomiques et aident dans la réparation des cassures double brins (**Postow 2004**) (**Figure 2**).

La variation de la topologie du chromosome est contrôlée par des protéines particulières nommées Topoisomérase qui relaxent ou condensent l'ADN. Elles interviennent dans le contrôle de la super-hélicité négative ou positive de l'ADN et aussi dans la résolution des emmêlements d'ADN appelées contraintes topologiques, c'est à dire la séparation de deux molécules d'ADNdb enchevêtrées l'une dans l'autre à divers degrés. Il existe deux classes de Topoisomérases chez *E. coli*. Celles de Type IA comme la Topoisomérase I (Topo I), qui ne peut pas résoudre les supertours positifs et la Topoisomérase III (Topo III). Et celles de Type II, comme la Gyrase, qui résoud la super-hélicité positive et crée de la super-hélicité négative, et la Topoisomérase IV (Topo IV) qui peut résoudre la super hélicité positive et négative et les caténanes (**Figure 2**). La Topo I et la Gyrase ont deux fonctions opposées ; la Topo I supprime les super-tours négatifs formés par la Gyrase (**Nolmann 2007**). La Gyrase et la Topo IV interviennent dans le processus de réplication de l'ADN en résolvant la super-hélicité positive créée en avant et en arrière des fourches de réplication. La Gyrase résoud la topologie en aval des fourches de réplication, et la Topo IV résoud les contraintes topologiques qui entrelacent deux copies d'ADN appelées « Pré-caténanes » en amont des

fourches et « Caténanes » une fois la réplication terminée (**Peter 1998, Rovinskiy 2012**). La Topo IV joue un rôle dans la séparation des deux copies du chromosome néo répliquées c'est à dire dans le processus de ségrégation de l'ADN (**Cf parties 2.3 et 2.4**).

La nature de la superhélicité négative de l'ADN et l'organisation en domaines topologiques ne peuvent pas expliquer à eux seuls le degré de compaction du nucléoïde. La représentation simple en boucle que l'on se fait d'un domaine topologique, est maintenue par un certain nombre de protéines. Certains de ces acteurs particuliers, qui semblent empêcher la rotation libre de ces domaines, sont les protéines SMC (maintenance structurale du chromosome). Les SMC sont retrouvées de manière ubiquitaire chez tous les organismes (eucaryotes, bactéries et archae). Elles ont été découvertes en premier chez la levure et jouent un rôle dans condensation et cohésion de l'ADN. Leurs rôles restent divers et interviendraient à tous les stades du cycle cellulaire (**Strunnikov 1993**). Chez les eucaryotes, il existe de nombreuses protéines différentes qui interviennent pour former le complexe SMC. Chez les bactéries, leur nombre est moins important. Chez les gamma-protéobactéries, deux groupes de protéines ont été caractérisées. Historiquement, MukB a été caractérisée chez *E. coli* comme jouant un rôle dans la ségrégation des chromosomes et c'est ensuite par homologie de structure que MukB a été caractérisée comme une SMC (**Hiraga 1989, Niki 1991, Graumann 1998, Melby 1998**). MukB intervient en complexe avec les protéines MukE et MukF (**Yamanaka 1996, Yamazoe 1999**). Le rôle du complexe MukBEF dans la condensation du chromosome, n'a été apporté qu'en montrant que MukB condense l'ADN enroulé négativement : une délétion de *mukB* peut être partiellement compensée par une sous-expression de la Topoisomérase I (qui diminue normalement la super-hélicité négative et décondense le nucléoïde), ou par une sur-expression de la Topo IV qui maintient la super-hélicité négative. Un phénotype *mukB*- se caractérise par une décondensation du nucléoïde avec une hypersensibilité aux inhibiteurs de Gyrase et l'apparition de cellules anuclées. Ce qui suggère à la fois un rôle dans la condensation et la ségrégation des chromosomes (**Danilova 2007, Hiraga 1991, Sawitzke 2000**). Récemment il a été montré que la localisation de MukB dans la cellule est indépendante de la réplication de l'ADN (**Badrinarayanan 2012**).

1.2-Structures des nucléoïdes

Les eucaryotes utilisent des histones, des protéines fortement chargées positivement, qui sont associées à l'ADN et permettent sa compaction. Les histones sont très conservées chez les eucaryotes, mais elles sont absentes chez les bactéries. Les bactéries utilisent une autre classe de protéine qui s'associe à l'ADN et le condense : les NAPs (Protéines Associées au Nucléoïde) (**Figure 3**). Les NAPs ne sont pas des homologues d'histones. Il existe une dizaine de NAPs différentes. Ces protéines ne forment pas de nucléosome et n'interagissent pas physiquement les unes avec les autres. Leur propriété commune est leur capacité à lier l'ADN et à le courber différemment selon la NAP fixée (**Figure 3**).

Les NAPs interviennent aussi dans la physiologie de la bactérie en régulant l'expression de certains gènes. Elles jouent un rôle dans le silencing (inhibition de l'expression de gène en masquant la zone promotrice) de certains gènes en fonction de la phase de croissance (exponentielle / stationnaire). Certaines des NAPs (Hu, Fis, IHF, Dps et H-NS) sont localisées en amas compacts dans la cellule et maintiennent les gènes qu'elles régulent dans ces regroupements (**Wang 2011**). On estime à 5% le nombre de gènes dont l'expression est régulée par les NAPs (**Hommais 2001**).

La concentration des NAPs dans la cellule est modulée en fonction de la phase de croissance de la bactérie : en phase exponentielle de croissance la concentration est en ce sens : Fis→HU→H-NS→IHF. En phase stationnaire on a cet ordre : Dps→IHF→HU→H-NS→Fis (**Figure 3B**). En phase stationnaire, le nucléoïde est plus condensé qu'en phase exponentielle, la régulation des gènes des NAPs y est donc différente. L'expression des gènes des ARNt et ARNr est modifiée par les NAPs Fis, H-NS et Lrp. Ces protéines régulent aussi l'expression de gènes intervenant par exemple dans les réponses au stress et la pathogénie (**Hillebrand 2005, Hirvonen 2001, Pul 2007**). Un exemple clair d'un tel changement de concentration est le cas de Fis qui voit sa concentration multipliée par 1000 en phase exponentielle de croissance (**Schneider 1999**). Fis augmente considérablement la transcription des ARNr, augmentant de ce fait le taux de la traduction. Fis intervient aussi directement dans la régulation de gènes codant pour la Gyrase et la Topo I. Fis régule positivement l'expression du gène *topA* (Topo I) en concentration basse (phase stationnaire) et négativement quand la concentration de Fis est plus importante en phase exponentielle. Fis a ainsi été montré comme influençant directement la super-hélicité de l'ADN (**Schneider 1999, Keane and Dorman 2003, Weinstein-Fischer and Altuvia 2007**).

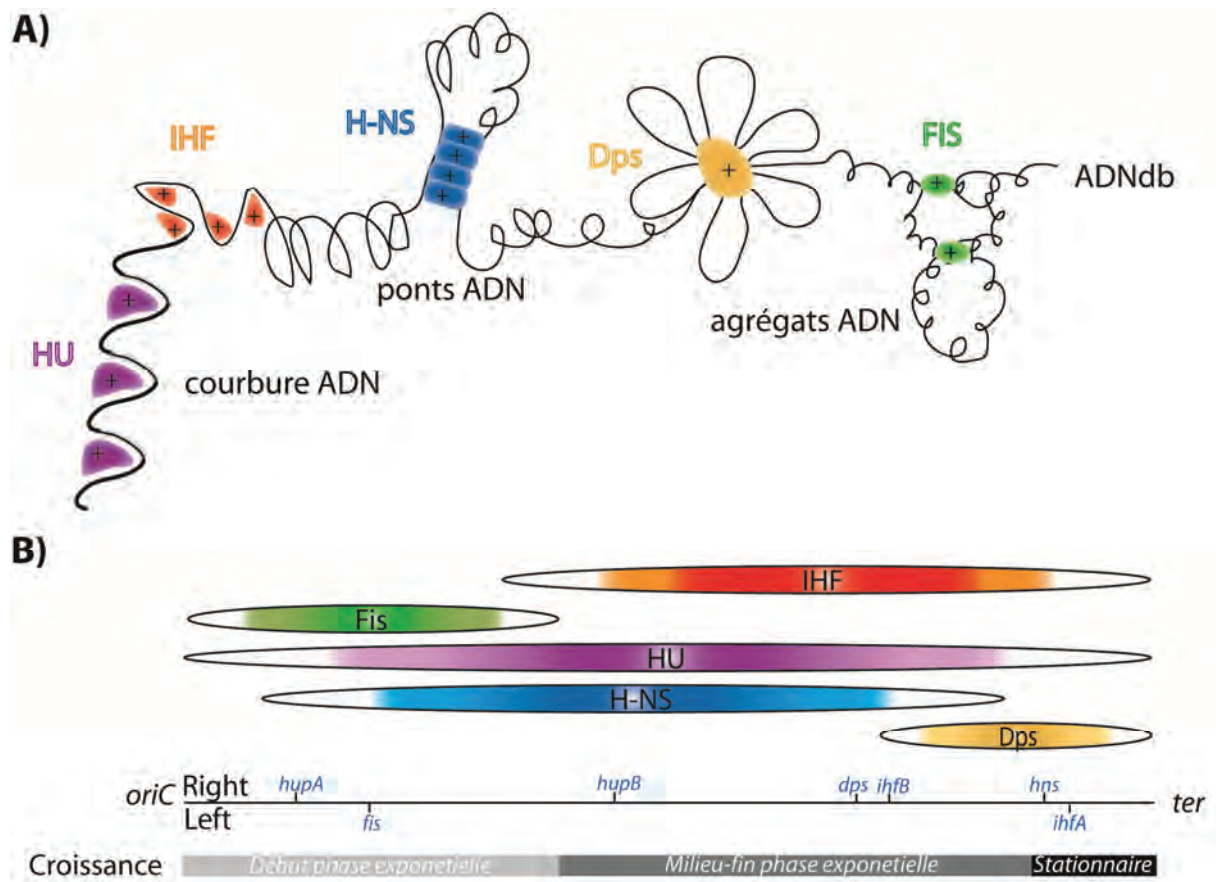


Figure 3. Protéines associées au nucléoïde (NAPs)

(A) Représentation des principales protéines associées au nucléoïde (HU, IHF, H-NS, Dps et Fis) selon leurs caractéristiques de liaison à l'ADN. (B) Concentration des différents NAPs au cours du cycle cellulaire en phase exponentielle et stationnaire de croissance.

Adapté de Dame 2011, Stavans 2006 et Rimsky 2011

Ces protéines n'ont pas de site de liaison spécifique sur le chromosome. IHF est la seule NAP décrite qui possède un motif consensus de liaison à l'ADN. La fixation d'IHF sur l'ADN crée un angle de plus de 160 degrés en forme de tête d'épingle. Parmi les différentes NAPs, HU qui se fixe coopérativement sur l'ADN, est la protéine la plus abondante dans la cellule. HU et IHF régulent l'expression et activité du facteur central dans la régulation de la réponse au stress, RpoS (**Stoebel 2009**). H-NS se lie non spécifiquement à l'ADN mais préférentiellement dans des régions courbées de manière à créer des ponts entre ADN (**Dame 2005**) (**Figure 3A**). H-NS contrôle l'expression d'une centaine de gènes intervenant dans la réponse au stress en empêchant la formation du complexe entre les promoteurs de ces gènes et l'ARN polymérase (**Dorman 2004, Nagarajavel 2007**). Les NAPs ont aussi été montrées comme protégeant l'ADN des mutations selon l'étape du cycle cellulaire (**Warnecke 2012**). Certains acteurs, comme Dps, sont spécifiques à une phase du cycle et donnent au nucléoïde un rôle de barrière dans la réponse au stress environnemental (**Grant 1998**). Il est important de noter aussi que parmi toutes les NAPs connues à ce jour, aucune n'est complètement essentielle pour la survie des cellules et le maintien de la structure du nucléoïde d'*E.coli* (**Reyes Lamothe 2012**).

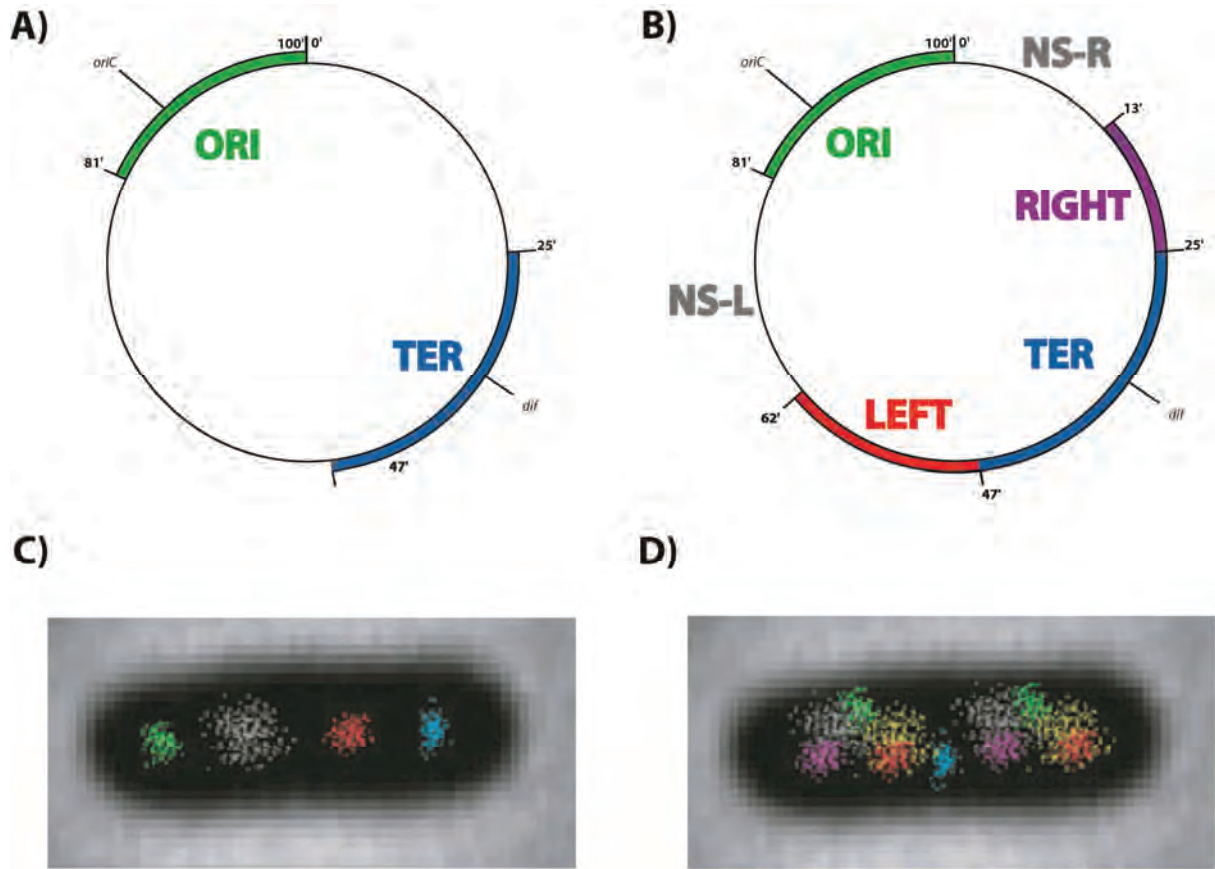


Figure 4 - Macro Domaines

(A,B) Macro Domaines Ori et Ter décrits par Niki et al, et Valens 2004. Territoires de plusieurs loci marqués en microscopie à fluorescence en début (C) de cycle cellulaire et en milieu / fin (D). Ces territoires représentent les différents MD (Ori en vert, NS-R en gris, Right en rouge et Ter en bleu, en jaune et violet sont représentés les territoires de loci dans NS-L et Left).

Adapté de Valens 2004 et Espeli 2008.

1.3-Organisation du nucléoïde en Macro-Domains

Chez les eucaryotes, l'organisation en domaines de l'ADN dans le noyau est un concept ancien, proposé par Rabl et Boveri en 1885 et qui a été confirmé bien plus tard dans les années 1980. Ces domaines possèdent une localisation particulière dans le noyau appelée « Territoire Chromosomique ». Ils ont été caractérisés en microscopie électronique et à fluorescence et sont définis en fonction de la nature de l'ADN, mais aussi en fonction de leur activité transcriptionnelle. La taille moyenne d'un territoire chromosomique est d'environ 1Mb.

Chez les bactéries, quand on regarde l'image du nucléoïde issue de microscopie on peut difficilement imaginer l'organisation du nucléoïde *in vivo* (**Figure 1A**). Pourtant, les gènes sur le chromosome, possèdent une localisation dans l'espace cellulaire qui leur est propre. Il existe deux régions principales sur le chromosome. Les régions où la réplication est initiée (Origine, Ori), et celle où elle est terminée (Terminale, Ter). Ces deux régions séparent le chromosome en deux bras suivant l'axe de réplication Ori→Ter.

La notion de Macro Domaine est apparue chez les bactéries après la caractérisation d'une organisation particulière des régions Origine et Terminale différentes des autres régions du chromosome (**Niki 2000**) (**Figure4A**). Après avoir marqué différents *loci* chromosomiques et observé leur localisation cellulaire par FISH, il a été observé que les *loci* de ces régions (0.8 à 1kb) disposent d'une localisation commune. Chez *Bacillus subtilis* et *Caulobacter crescentus*, une organisation similaire des régions Ori et Ter dans la cellule a aussi été observée. Cette organisation suggère qu'à une position chromosomique particulière, est attachée une localisation cellulaire spécifique : la position de certains *loci* chromosomiques dans la cellule n'est pas aléatoire (**Teleman 1998, Wu and Errington 1998, Viollier 2004**).

Dans un premier temps, c'est la localisation en microscopie à fluorescence qui a permis de caractériser des régions en tant que régions hautement structurées. Cependant dans ces analyses, ce n'est pas l'interaction physique entre *loci* qui a été mesurée. Le terme Macro-Domaine n'est apparu que suite à la mesure de l'interaction physique entre *loci* (**Valens 2004**) (**Figure 4B**). L'analyse de la structure du nucléoïde *in vivo* dépend de la robustesse et facilité d'utilisation des outils génétiques. Chez *Salmonella*, l'utilisation du système de recombinaison $\gamma\delta$ Res n'a pas permis de caractériser des interactions de *loci* très éloignés, se contentant d'analyse topologique d'une région large de quelque dizaine de kb (**Higgins 1996**). Chez *E.coli*, l'utilisation du système de recombinaison du phage Lambda a permis de surmonter le problème de perte de recombinaison entre *loci* éloignés. Le pourcentage de recombinaison entre les séquences de recombinaison du phage lambda (sites *att*) a été mesuré

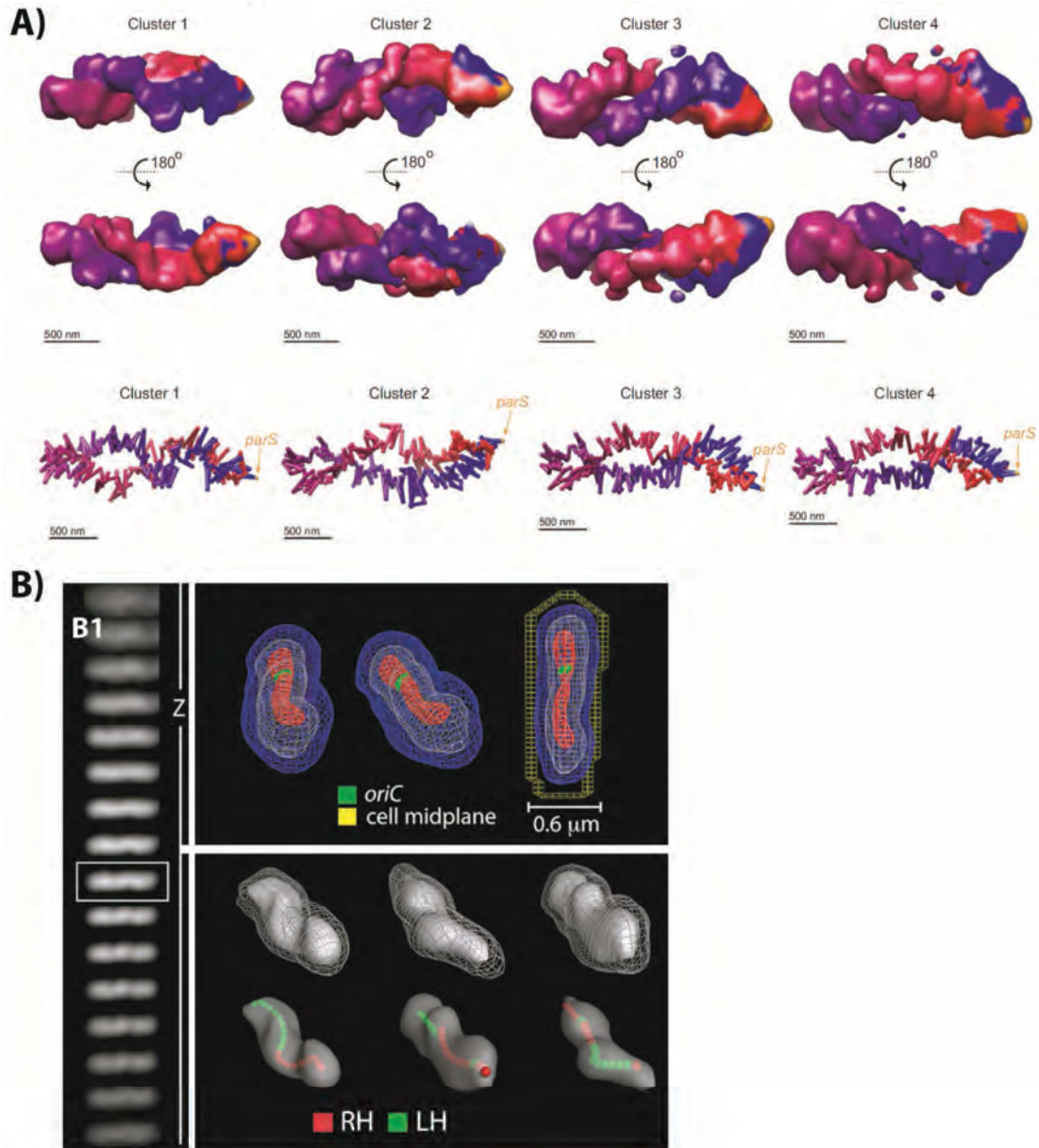


Figure 5 - Forme des nucléoïdes

(A) Différentes organisations 3D du nucléoïde chez *C. crescentus* (swarmer cell qui ne peuvent pas se répliquer). Ces représentations ont été obtenues après l'analyse des données issues de 5C (Chromosome Conformation Carbon Copy, Umbarger 2011). Ces formes du nucléoïde sont les quatre formes majoritaires observées. En dégradé de Bleu et Rouge sont représentés les bras droit et gauche du chromosome. Cette représentation est reprise dans la partie 2 sur les modèles d'organisation et de ségrégation des chromosomes bactériens. **(B)** Analyse de la structure du nucléoïde in vivo en 3D après la reconstitution d'image prises dans l'axe Z (B1). Cette méthode permet d'analyser en temps réel la dynamique du nucléoïde puisqu'une analyse peut être effectuée toute les 5 secondes. LH et RH représentent les bras gauche et droit du chromosome d'*E. coli*. La figure 17 explique la dynamique du nucléoïde d'*E. coli* au cours du cycle cellulaire en utilisant cette méthode.

Adapté d'Ubarger 2011 et Fisher 2013

à différentes positions du chromosome. Après plus de 200 combinaisons possibles entre les sites *att* testés, quatre domaines structurés (les Macro Domaines Ori, Left, Right et Ter) et deux régions non structurées (NS-Left et NS-Right) ont été caractérisées (**Valens 2004**) (**Figure 4B**). Les MD Ori et Ter correspondent à ceux décrits précédemment par FISH, et les deux autres, Left et Right ont été caractérisés dans ces travaux (**Niki 2000, Valens 2004**). Les régions non structurées, nommées NS-Right et NS-Left, correspondent aux régions où les *loci* interagissent autant avec des *loci* des autres MD qu'avec des *loci* plus proches.

Les analyses physiques de recombinaison entre *loci*, permettent de définir un MD comme une région chromosomique où les *loci* ont tendance à interagir plus fréquemment avec les *loci* de cette même région qu'avec des *loci* en dehors de cette région (**Figure 4CD**).

Les MD ont une dynamique qui leur est proche au cours du cycle cellulaire (**Espeli 2008**) (**Figure 4CD**). Si le mécanisme moléculaire qui permet de comprendre l'organisation en MD est encore inconnu pour la majorité des domaines à ce jour, il n'en reste pas moins que la liaison séquence-spécifiques de protéines dans ces régions, les organisent. Parmi ces protéines, on trouve SeqA, SlmA, MukB, et MatP qui sont décrites dans les parties 2 et 3 de l'introduction.

1.4-Conformation des nucléoïdes

Des techniques récentes ont permis d'analyser la forme des nucléoïdes chez *E.coli* et *C.crescentus* (**Umbarger 2011, Fisher 2013**). Le 3C (Capturing Chromosome Conformation) est une technique développée chez *Saccharomyces cerevisiae*, qui a ensuite été adaptée pour la première fois chez les procaryotes chez *C.crescentus* (**Dekker 2002, Umbarger 2011**). Le 5C (Capturing Chromosome Conformation Carbon Copy) est une évolution du 3C qui permet d'augmenter la précision des interactions mesurées jusqu'à 13kb de résolution. Cette technique consiste en la mesure de probabilités d'interaction entre *loci*. Ces fréquences de contact sont transformées en une distance physique pour une paire *loci* donnée et sont représentées en 3D (**Figure 5A**). L'analyse de plus de 100 marqueurs sur le chromosome est nécessaire (**Umbarger 2011**). Cette technique permet de représenter des nucléoïdes à l'échelle topologique (10 kb). Chez *C. crescentus*, le nucléoïde est organisé en forme d'ellipse avec un réarrangement périodique des sous-domaines du nucléoïde (**Umbarger 2011**). Quatre différentes conformations du nucléoïde ont été obtenues après analyse des données dans cette étude (**Figure 5A**). Ces conformations ne prennent pas en compte toutes les différentes possibilités de conformation sous-cellulaire, mais toutes suggèrent, que la localisation des *loci*

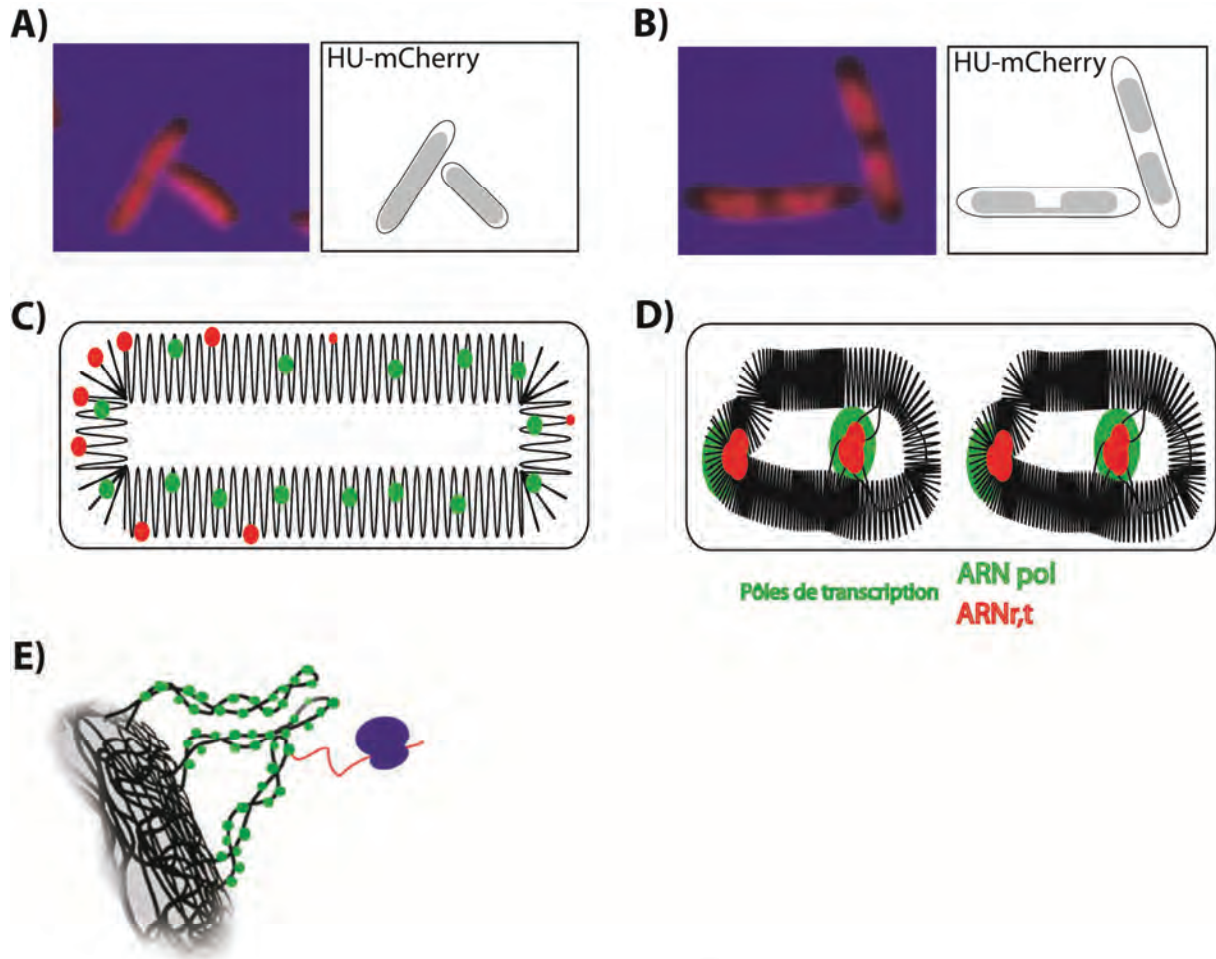


Figure 6 - Organisation transcriptionnelle du nucléoïde.

(A,B) Organisation du nucléoïde marqué par une fusion HU-mCherry en condition lente (A) et rapide (B) de croissance. (C,D) Organisation des pôles de transcription en condition lente (C) et rapide (D) de croissance. (E) Aperçu de la périphérie du nucléoïde où les gènes sont majoritairement transcrits (ARN pol en vert) puis les ARNm (rouge) traduits par les ribosomes (Bleu).

Adapté de Jun 2006

est contrainte dans la longueur, et non dans le petit axe de la cellule, confortant l'organisation hélicoïdale du chromosome. Dans la partie III de l'introduction, je détaillerai la technique de 4D qui, développée chez *E.coli*, permet d'étudier en temps réel la dynamique du nucléoïde via une technique de microscopie à haute résolution (**Fisher 2013**) (**Figure 5B**). Dans ces travaux, la perte d'attaches dans le petit axe de la cellule serait responsable du changement d'organisation du nucléoïde chez *E. coli*.

1.5-Occupation de l'espace cellulaire hors du nucléoïde

La périphérie du nucléoïde est un espace où la majorité des gènes sont transcrits et traduits mais la dynamique des unités de transcription et traduction restent très peu décrite à ce jour chez les bactéries. Les protéines de liaison à l'ADN occupent des régions particulières dans le nucléoïde appelées EPOD (Extensive Protein Occupancy Domain) de tailles comprises entre 1 et 10kb (**Vora 2009**). Les EPOD sont divisés en deux familles. Les domaines d'occupation où peu de gènes sont transcrits, et où il n'y a pas ou peu de gènes essentiels (tsEPOD). A l'opposé, les domaines d'occupation où l'activité de l'ARN polymérase est élevée, et où on retrouve aussi les gènes codant pour les ARNt (heEPOD). Dans les tsEPOD, on observe une concentration des protéines H-NS et IHF plus importante que dans les heEPOD (**Vora 2009**). La transcription est aussi responsable de l'organisation du nucléoïde puisque, comme décrit précédemment, les NAPS peuvent réguler l'expression de certains gènes en fonction des conditions de croissance. En condition de croissance rapide, de nombreux gènes codant pour les ARN ribosomiques sont transcrits (**Figure 6BD**). Les ribosomes de part leur taille sont exclus du nucléoïde et de ce fait la transcription / traduction se fait en périphérie du nucléoïde (**Li and Jensen 2009**) (**Figure 6E**). Pour les gènes codant pour des protéines membranaires, le couplage de la transcription, la traduction et de l'insertion dans la membrane des protéines naissantes est appelée transersion. Une localisation rapide de ces gènes à la membrane est observée (**Libby 2012**). Cette localisation à la membrane est différente de l'exclusion du nucléoïde lors de la transcription / traduction des autres gènes ne codant pas pour des protéines membranaires.

Le flux de l'information génétique dans le nucléoïde est conduit principalement par les ARNm. La durée de vie d'un transcrit n'excède pas les 8 minutes pour 80% d'entre eux. Les ARNm diffusent faiblement de leur point de synthèse dans le nucléoïde (**Bernstein 2002**). Les localisations des ARNm, ribosomes et protéines de dégradation des ARNm diffusent peu,

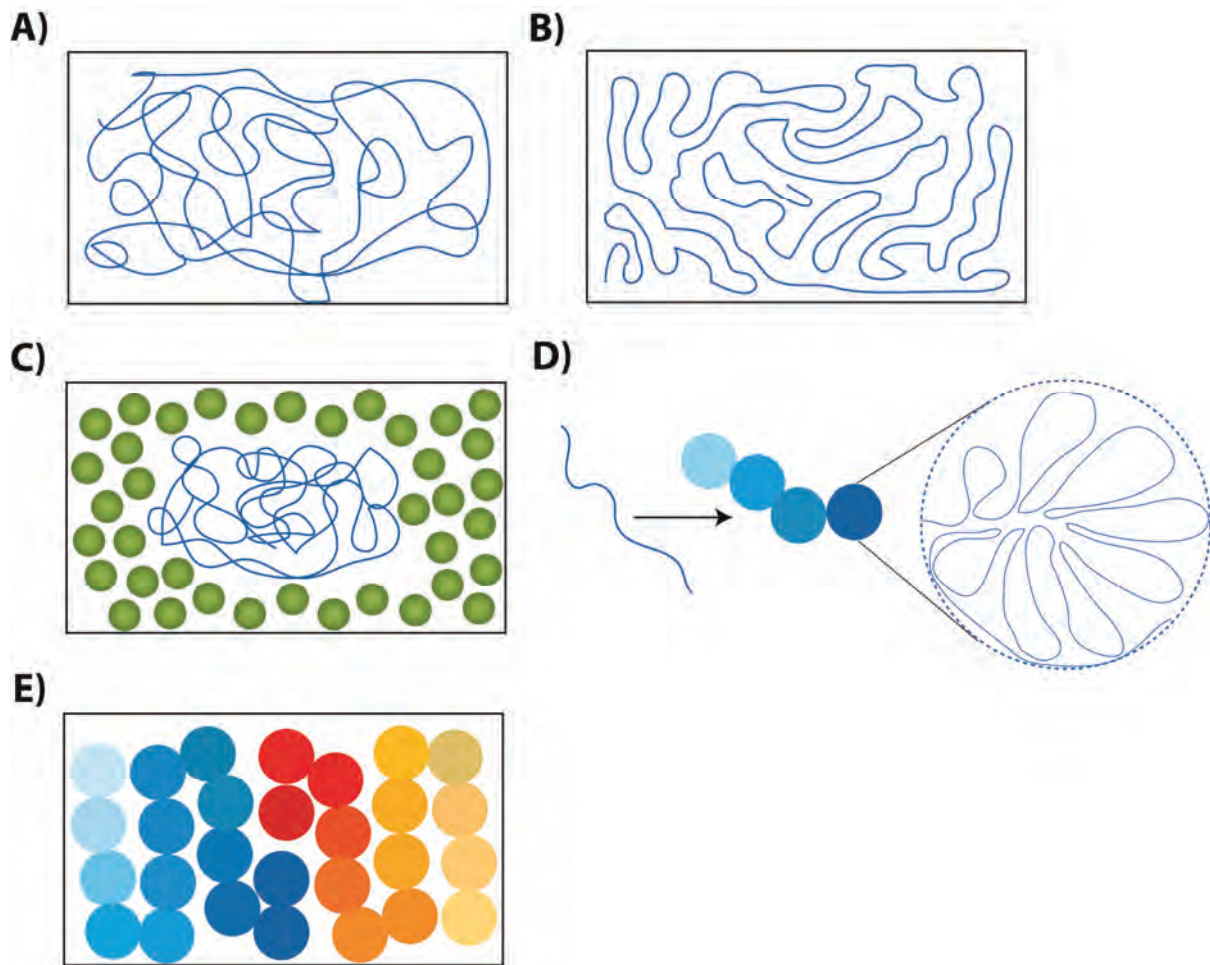


Figure 7 - Physique du nucléoïde

(A) Représentation d'un polymère dans un espace fermé. (B) Ajout de forces liées à l'encombrement moléculaire avec un polymère dans un espace fermé. Cet encombrement est représenté par des sphères vertes. (C) Self Avoiding Walk d'un polymère. Le polymère ne peut se conformer que d'une certaine manière. (D) Représentation de l'organisation d'un polymère en domaines topologiques. (E) Exemple d'organisation de deux polymères (disposant de domaines topologiques) dans un espace confiné après équilibre.

et localisent la majorité du temps à proximité du gène chromosomique transcript / traduit (**Montero Llopis 2010**).

1.6-Physique du nucléoïde

Modéliser l'organisation du nucléoïde par des prédictions permet de prévoir le changement de structure du nucléoïde quand certains paramètres comme la topologie, condensation et/ou osmolarité sont changés. De plus en plus de publications concernent la modélisation de la dynamique du nucléoïde d'*E. coli* ou *C. crescentus*, pour comprendre plus précisément la physique de la compaction du chromosome et son architecture au cours du cycle cellulaire. Ces modèles montrent, par exemple, que le confinement des domaines du chromosome à des positions spécifiques a une forte influence sur l'arrangement spatial du chromosome dans la cellule (**Buenemann 2010**). Dans cette partie, je vais discuter brièvement de certaines notions physiques comme l'encombrement moléculaire et la notion de polymère qui sont utilisées dans les modèles physiques pour comprendre l'organisation du nucléoïde.

Pour répondre aux questions liées à l'organisation, compaction et stabilité d'un nucléoïde d'un point de vu « physique », il faut assimiler un chromosome à un polymère flexible, et une membrane cellulaire à un espace confiné (**Figure 7AC**). Le polymère a une conformation qui peut être calculée à l'aide de formules mathématiques et de nombreux paramètres et acteurs limités sont pris en compte (Super-hélicité de l'ADN, encombrement moléculaire etc ...) (**Figure 7B**). *In vivo* il est impossible de tendre vers un équilibre parfait du système étant donné la complexité des acteurs, ceux qui restent à décrire et l'instabilité du système. L'intérêt des modèles physiques est qu'ils permettent de contrôler tous les paramètres présents et donc de comprendre la dynamique de macromolécules telles que les polymères. L'objectif de ces modèles est de savoir quelle conformation le polymère adopte en fonction des changements des paramètres.

L'ajout d'un niveau de complexité au polymère avec l'introduction de domaine topologique, permet de se rapprocher du modèle *in vivo* (**Figure 7D,E**). Si on ajoute un deuxième polymère dans cet espace confiné, l'organisation du premier polymère change dans l'espace confiné. On peut s'interroger alors sur l'organisation de ces deux polymères en la conformation la plus stable, en tenant compte des interactions entre les deux polymères et leurs dynamiques (**De Vries 2010**).

Différents paramètres sont à prendre en compte pour modéliser la compaction du nucléoïde :

(i) *Les Polymères flexibles* font allusion à la conformation qu'adopte l'ADN quand il est soumis non spécifiquement à un encombrement macromoléculaire dans la cellule.

(ii) *La neutralisation des charges de l'ADN* est un autre paramètre à prendre en compte. Par exemple, on estime que si plus de 90% des charges négatives de l'ADN sont compensées par la fixation de cations multivalents, alors l'ADN peut être condensé en domaines (**Bloomfield 1997**). Il est difficile de caractériser la neutralisation des charges négatives de l'ADN, mais, on estime qu'*in vivo*, une partie des charges négatives de l'ADN est neutralisée par la liaison des NAPs, mais insuffisamment pour assurer à elles seules la condensation de l'ADN *in vitro* (**Murphy and Zimmerman 1995**).

(iii) *La super-hélicité de l'ADN et l'angle formé par la fixation des NAPs* comme IHF sur le chromosome modifient la mécanique physique du chromosome. Leur effet sur la compaction est notable.

(iv) *L'encombrement moléculaire*

La topologie de l'ADN, la présence de SMC et de NAPs, excluent une majorité de protéines du nucléoïde qui se retrouvent alors en périphérie. L'encombrement moléculaire correspond aux mouvements et forces des molécules à la périphérie du nucléoïde. Chaque protéine, de part sa mobilité et ses propriétés, exerce indirectement des forces en périphérie du nucléoïde et au niveau de la membrane rigide. Ces forces ont une incidence sur le degré de compaction du nucléoïde. La quantité et la nature des protéines à la périphérie du nucléoïde varient au cours du cycle cellulaire. En observant la compaction du nucléoïde en phase exponentielle de croissance et en phase stationnaire, on remarque une augmentation nette de la compaction du nucléoïde en phase stationnaire (**Figure 6AB**). Dans un milieu riche, les cellules d'une population bactérienne disposent d'un grand nombre de copies du chromosome. Le niveau d'expression des gènes est plus important qu'en milieu pauvre, où le nombre de copies du chromosome est moindre. Le nucléoïde a une forme compacte en milieu riche et décondensée en milieu pauvre (**Figure 6AB**). Par exemple, on observe des *foci* denses en marquant l'ARN polymérase en condition rapide de croissance (**Jin 2006**) (**Figure 6D**). Ces *foci* disparaissent en condition lente de croissance (**Figure 6C**).

La super-hélicité du chromosome, la répulsion des charges négatives entre molécules d'ADN et la liaison des NAPs et autres protéines, sont principalement les trois forces responsables de l'organisation du nucléoïde en une structure compactée (**Browning 2010, Rimsky 2011**).

Pour un modèle physique, ne seront pris en compte, que trois principaux paramètres pour *l'encombrement* moléculaire : la pression osmotique (concentration en sel), l'exclusion du volume (qui entoure le polymère flexible) et la variation d'énergie du système, qui sont trois paramètres importants de l'encombrement moléculaire (**Murphy and Zimmerman 1995**). Ces paramètres ont peu d'incidence sur la compaction du nucléoïde lorsqu'analysés indépendamment les uns des autres dans un système physique. Cependant, s'ils sont tous pris en compte dans un même modèle, leur synergie permet, *in silico*, une compaction d'un polymère en un nucléoïde (**De Vries 2010**).

La comparaison des résultats obtenus *in vivo* et par des modèles physiques, permet de relativiser la complexité affichée des modèles *in vivo*. En effet, jusqu'à présent, l'organisation du nucléoïde *in vivo* est assez mal comprise étant donné la quantité importante d'acteurs différents connus pour le maintien de l'organisation du nucléoïde.

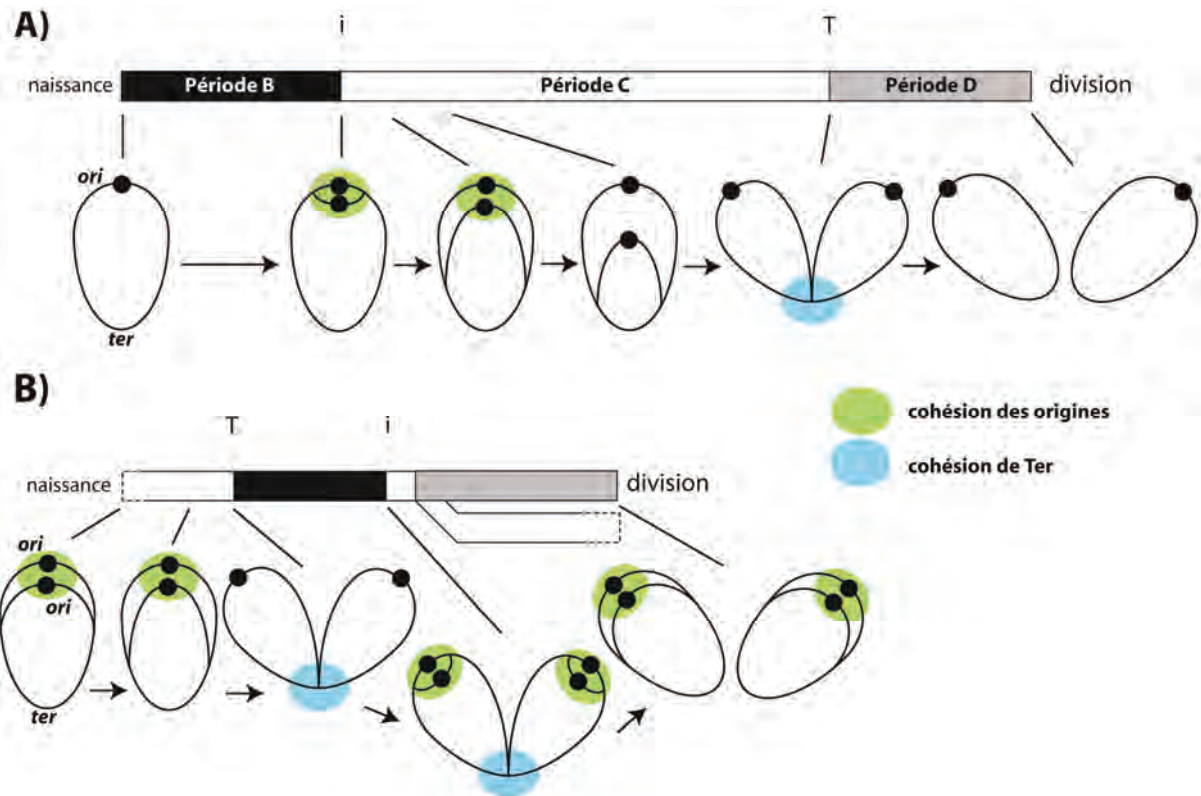


Figure 8 - Introduction au cycle cellulaire

(A) Périodes B, C et D quand il n'y a pas de cycles répliatifs chevauchants. Les trois périodes sont distinctes et ne se superposent pas. (B) Exemple de cycle répliatif en conditions rapides de croissance, quand les cycles répliatifs se chevauchent. Quand la cellule vient de se diviser, elle est déjà en cours de répliatif de la génération précédente. Cette répliatif terminée, elle est ré-initiée et continue alors que la formation du septum de division s'amorce.

Adapté de Adashi 2008

2 - Cycle cellulaire

2.1-Périodes BCD

On entend par « cycle cellulaire » les différentes étapes qui mènent à la formation de deux cellules filles à partir d'une cellule mère. On peut diviser le cycle cellulaire bactérien en trois grandes périodes : B, C et D. Ces périodes correspondent respectivement, aux périodes d'initiation (entre la fin de la division et le début de la réplication), de réplication (duplication du matériel génétique) et de division (entre la fin de la réplication et la septation) (**Figure 8A**). La période B est une période encore mal décrite à ce jour puisqu'on ignore comment fonctionne le mécanisme qui serait le point de contrôle principal de la réplication chez les bactéries : la masse d'initiation (**Donachie 1968**). En effet, il faudrait que la cellule atteigne une certaine masse pour que la réplication commence, mais on ignore comment la bactérie ferait pour sonder cette masse d'initiation.

En condition de croissance native (corps humain, 37°C) le cycle cellulaire d'*E. coli* a un temps de génération (t , période égale au temps de doublement soit la somme des périodes B, C et D) d'environ 20 minutes (**Longuet-Higgins 1960**). Or, pour répliquer (période C) les 4,6 Mb du chromosome circulaire de cette bactérie, il faut 40 minutes dans des conditions optimales de croissance. Cela sous-entend que la réplication de la génération en cours a commencé à la génération d'avant, puisqu'il faut compter le temps nécessaire pour que les événements post-réplicatifs (cohésion, ségrégation, septation) aient lieu (période D). Dans de telles conditions de croissance, $C+D > t$. En condition rapide de croissance, il y a un chevauchement des cycles réplicatifs, de manière à avoir jusqu'à 8 ou 16 origines de réplication en même temps (**Figure 8B**). En condition très lente de croissance ($t > 110$ minutes) où il y a au maximum deux copies du chromosome, les périodes B, C et D ne se chevauchent pas et la somme des trois correspond au temps de génération (**Figure 8A**). Dans un cycle cellulaire lent (**Figure 8A**), l'observation des différents événements du cycle cellulaire est plus aisée que dans un cycle rapide où ces événements s'effectuent dans des fenêtres de temps plus courtes et peuvent être chevauchants. Un cycle lent permet de faire l'analogie des périodes B, C et D avec les périodes G1, S et G2-M chez les eucaryotes.

Comme précisé précédemment, la richesse du milieu fait varier la vitesse du cycle cellulaire. La nature même de la souche a aussi une incidence sur les paramètres du cycle cellulaire. Dans des conditions de croissance identiques, les souches dérivées d'*Escherichia coli* K12 comme AB1157 (**Kantor and Deering 1968**), MG1655 ou NK9387 (**Bates and Kleckner 2005**) ont des cycles cellulaires très différents. AB1157 possède par exemple plus

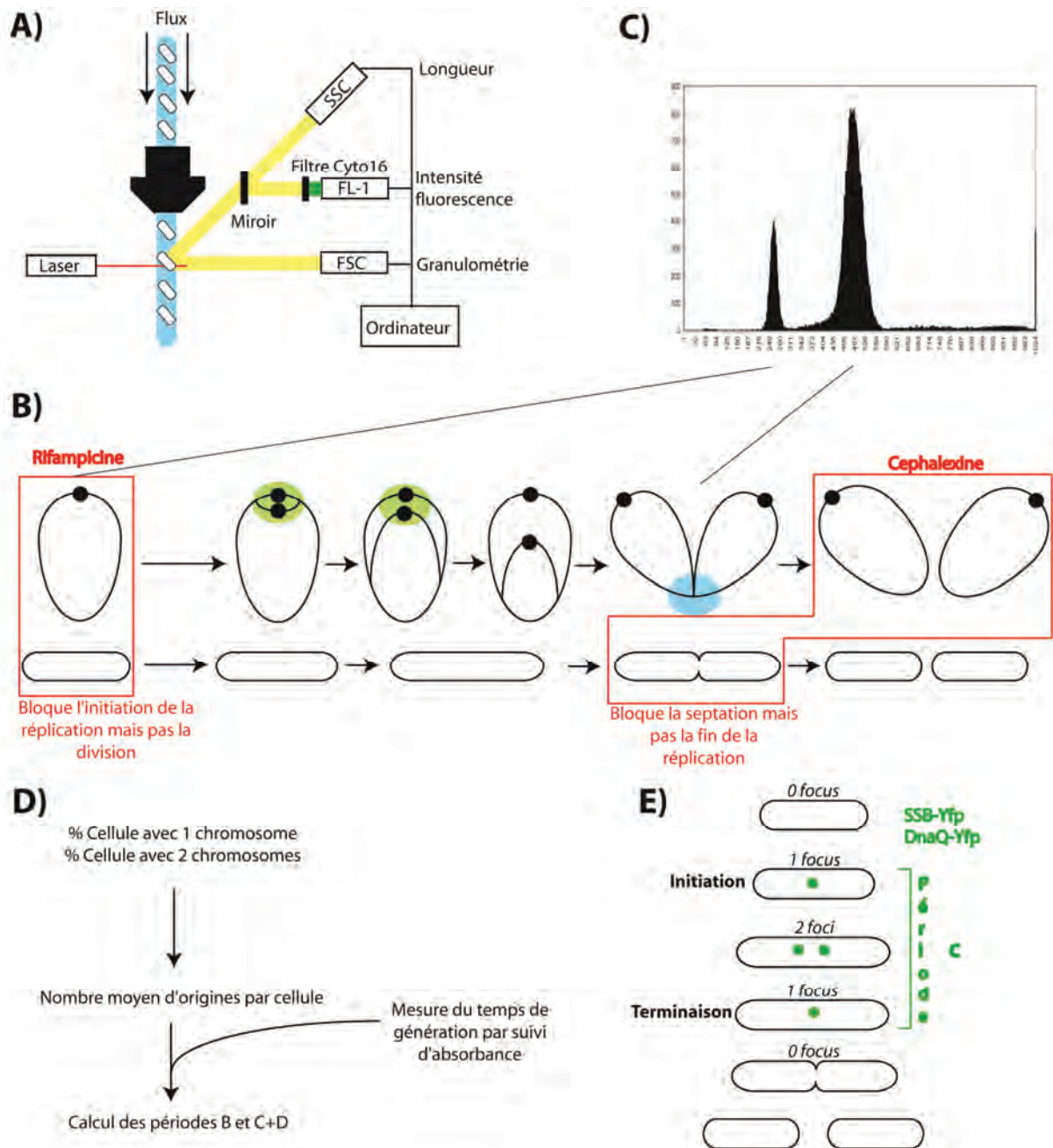


Figure 9 - Analyse du cycle cellulaire

(A) Principe de la cytométrie en flux. La longueur, granulométrie et intensité de fluorescence de chaque bactérie, sont mesurées. **(B)** Représentation de l'intensité de fluorescence par puits (abscisse) en fonction du nombre de cellules. Ici les pics représentent le nombre de cellules avec une ou deux quantités d'ADN. **(C)** Principe de préparation des échantillons pour bloquer la septation et l'initiation de la réplication. **(D)** Principe de l'extraction des données de cytométrie pour paramétrer le cycle cellulaire. **(E)** Principe de la mesure de la période réplivative dans une souche possédant une protéine du replisome marquée avec un fluorophore (ici SSB et DnaQ marquées avec la Yfp).

de 20 gènes mutés par rapport à MG1655 dont certains impliqués dans le métabolisme du pentose et du ribose. Dans des conditions similaires de croissance, le cycle de MG1655 est différent du cycle d'AB1157 : en M9 Glycérol à 37°C, AB1157 possède au maximum deux copies du chromosome alors que MG1655 peut en posséder quatre. La température (30°C, 37°C, 42°C) et la source carbonée (glucose, maltose, glycérol, alanine, acétate) sont des exemples de paramètres qui permettent de moduler les durées des périodes B, C et D.

Analyser le cycle cellulaire d'une souche de laboratoire pour connaître la durée de ces périodes est important. (i) Cela permet de mesurer les différents événements du cycle ; connaître leur durée exacte permet de définir une fenêtre de normalité qui diffère généralement en contextes mutants. (ii) Certaines conclusions passées sur l'analyse du cycle cellulaire sont maintenant erronées quand les analyses sont refaites dans des conditions de croissance plus appropriées. (iii) Les interprétations faites de l'observation de *foci* en microscopie à fluorescence ne peuvent être claires que dans un contexte où le nombre de chromosome est connu et contrôlé.

Pour analyser le cycle cellulaire d'une souche bactérienne d'*E. coli*, il existe différents moyens. Le plus utilisé est la cytométrie en flux (**Figure 9A**). Cette méthode est relativement ancienne puisque le principe, qui consiste à faire circuler des cellules dans un tube capillaire qui passent ensuite devant un détecteur photoélectrique, a presque 80 ans (**Moldovan 1934**). Ce n'est que 60 ans après, que la première machine a été commercialisée. Les cytomètres en flux de nos jours sont des appareils haut débit pouvant analyser jusqu'à 100.000 particules en moins de 30 secondes. Le cytomètre, pour chaque objet qui passe devant ses capteurs, mesure avec un laser la taille (Side Scatter ou SSC), la masse (Forward Scatter ou FSC) et la fluorescence d'un objet (**Figure 9A**).

La cytométrie en flux est une technique qui enregistre de nombreuses informations dont la quantité 'n' de chromosome pour chaque cellule analysée. Les cellules sont analysées dans une population en phase exponentielle de croissance, où l'initiation de la réplication et la septation ont été bloquées par l'ajout d'antibiotiques (Cephalexine et Rifampicine). Ceci de manière à ce que comme présenté **Figure 9C**, on ait uniquement des cellules avec une et deux quantités de chromosomes et aucun intermédiaire. On peut ensuite représenter la quantité de fluorescence pour chaque cellule (**Figure 9B**). Connaissant le temps de génération calculé par une analyse de l'absorbance, on peut extraire à partir des pourcentages de chromosome moyen par cellule : le nombre moyen d'origine. Ainsi, comme l'explique la **Figure 9D**, on peut obtenir la durée des périodes C+D. A l'aide de logiciels informatiques, des données de cytométrie et du temps de génération, on peut définir *in silico* les durées des périodes B, C et D (**Michelsen 2003, Stokke 2012**).

Associée à la cytométrie, une mesure du cycle répliatif (période C) *in vivo* peut être effectuée en utilisant un marqueur fluorescent d'un acteur du réplisome. La durée entre l'apparition et la disparition des *foci* du réplisome peut être mesurée et moyennée en microscopie à fluorescence. La période C peut ainsi être mesurée. Connaissant la période C+D, mesurée par cytométrie et la période C, mesurée par l'analyse du cycle répliatif, on peut extraire la durée des périodes B et D (**Figure 9E**).

Afin d'affiner l'analyse du cycle cellulaire, des méthodes permettent de synchroniser toute une population cellulaire afin que l'observation en microscopie soit la même de cellule à cellule à un temps donné. On peut synchroniser des cellules de plusieurs manières différentes. (i) En arrêtant le cycle des cellules à une étape clef du cycle cellulaire et en laissant accumuler toutes les cellules de la population à cette étape avant de relâcher le blocage du cycle. L'arrêt de l'initiation de la réplication par un mutant DnaA ou DnaC (ts) (**Voir partie 2.2**) permet ce genre de synchronisation, l'inconvénient étant que cet arrêt perturbe la physiologie de la cellule (**Carl 1970**). (ii) La deuxième manière est de séparer physiquement certaines catégories de cellules (celles qui viennent de naître par exemple) à l'aide d'un « extracteur » particulier appelé « Baby Machine » (**Helmstetter and Cummings 1963**). Les cellules d'une population en croissance exponentielle sont attachées à une membrane. Seules les cellules nouvellement nées sont récupérées. Avec des prélèvements à certains temps et dans ces conditions, la physiologie du cycle n'est pas perturbée. L'inconvénient étant que peu de cellules sont récupérées sur de courtes durées. Une méthode dérivée de la Baby Machine appelée « Baby Column » permet de produire plus de cellules en attachant les cellules sur des billes dans une colonne via un flagelle (**Bates 2005**). Les cellules sur les billes sont cultivées sur ces billes avec l'un des gènes essentiel pour le flagelle réprimé. Les premières cellules sur les billes sont les seules à être attachées, de manière à ce que seules les cellules qui étaient déjà attachées aux billes y restent et que les cellules nouvellement née soient éluées.

2.2-Réplication des chromosomes

Les chromosomes bactériens ont une réplication orientée, de l'origine de réplication (*ori*) où la réplication est initiée, en direction de la région Terminale du chromosome (*ter*), où la réplication est terminée. On distingue ainsi deux régions sur le chromosome : la région Origine et la région Terminale. L'axe de l'origine à la terminaison de la réplication sépare le chromosome en deux parties appelées « réplimore gauche » et « réplimore droit » (**Figure 10A**).

Le mécanisme réplimatif consiste en la synthèse continue d'un des deux brins (brin meneur ou Leading) du chromosome et discontinue de l'autre (brin retardé ou Lagging) (**Figure 10E**). Il existe une disparité de répartition des bases azotées entre les brins Leading et Lagging. Chez *E. coli*, le brin Leading est généralement plus concentré en G et T (thymine) qu'en A (adénine) et C (cytosine) et inversement pour le Lagging. Cette discrimination en faveur des GT par rapport au CA a diverses origines : mutation préférentielle des cytosines en thymine, préférence de la troisième base du codon pour un G/T plutôt qu'un C/A, présence de motifs riches en purines ou en G comme les séquences Chi et KOPS (voir plus loin) (**Lobry 2002, Tillier 2000**). Le rapport (G-C)/(G+C) ou biais GC est généralement positif pour le brin Leading et inversement pour le Lagging. Cette différence de biais GC entre les deux brins permet de déterminer l'origine et la terminaison de la réplication puisque c'est au niveau de ces deux régions que le biais GC change (**Lobry 1996, Rocha 2006**). La densité génique varie elle aussi en fonction des brins Leading et Lagging. Chez *B. subtilis*, le brin leading possède 95% des gènes essentiels alors que le brin lagging n'en possède que 25% (**Rocha 2003**).

2.2.1-Initiation et terminaison de la réplication

Chez *E. coli* la réplication est initiée à l'origine unique de réplication *oriC* via la fixation de la protéine DnaA, qui permet la création du complexe d'initiation. Ce complexe ouvre l'ADNdb au sein d'une bulle et permet au complexe de l'ADN polymérase de débiter la réplication de l'ADN (**Figure 10BCD**). La réplication n'est initiée qu'une seule fois par cycle cellulaire et est hautement régulée. La transcription du gène *dnaA* augmente avant l'initiation de la réplication et est réprimée par la liaison de DnaA-ATP sur son promoteur. L'initiation de la réplication est régulée par les variations de concentration en DnaA-ADP/ATP. Deux séquences nommées DARS (DnaA Reactivating Sequence) sur le

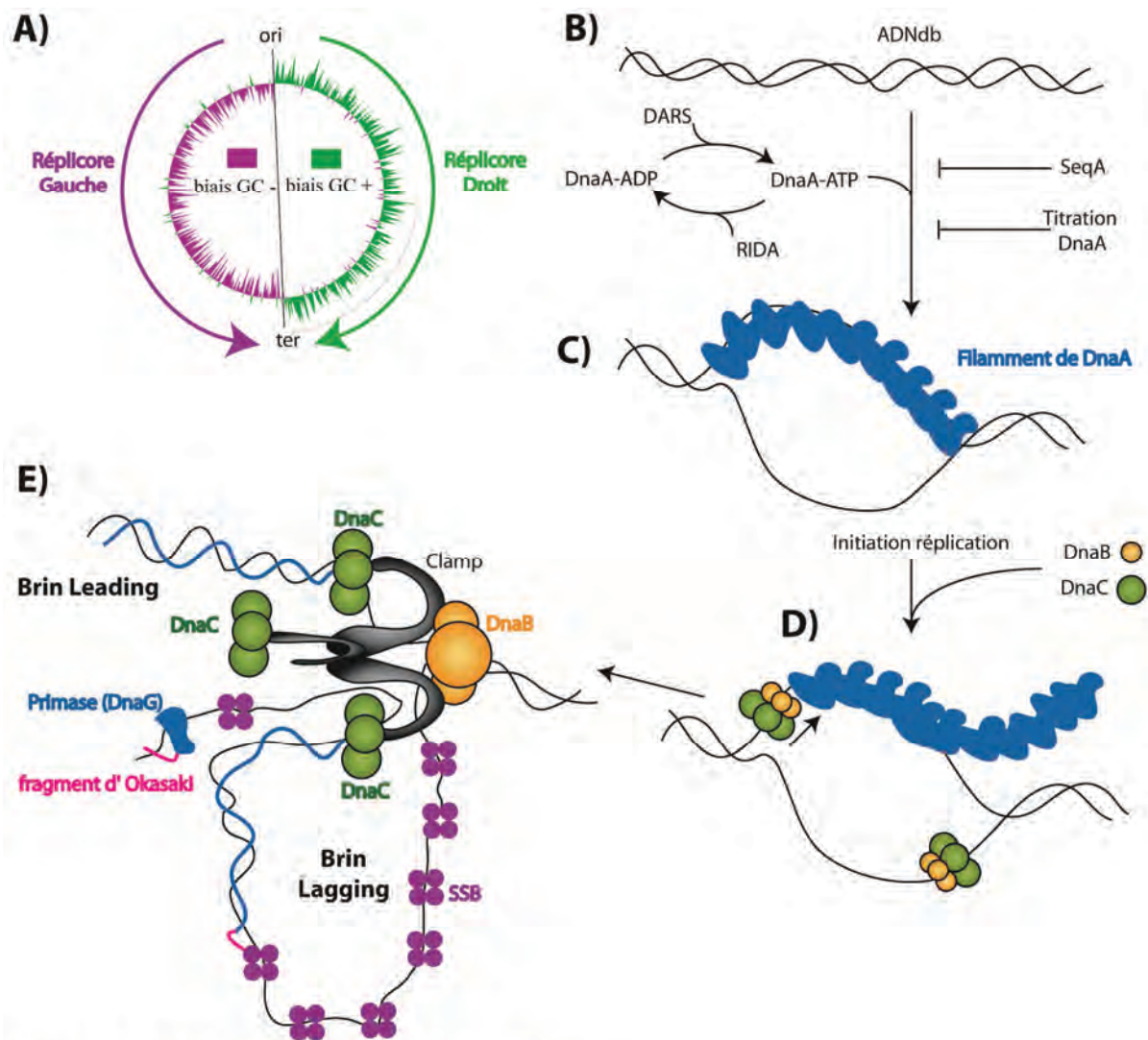


Figure 10 - Biais GC et formation des réplisomes.

(A) Représentation du biais GC qui change dans la région Origine et Terminale. (B-E) Formation du réplisome. (B-C) La formation du réplisome est régulée par la concentration en DnaA-ATP qui forme un filament et ouvre l'ADN double brin. (C-D) Le chargement d'autres protéines comme DnaB et DnaC permet de chasser les Dna-ATP présents et (D-E) facilite le chargement et la formation du réplisome. (E) Réplication active avec le brin meneur (Leading) et retardé (Lagging). Sur le brin lagging la synthèse de plusieurs fragments d'Okasaki est nécessaire pour suivre la réplication. SSB stabilise l'ADN simple brin sur le lagging.

Adapté de Nolivos 2010 et Reyes-Lamothe 2012

chromosome, contrôlent la concentration en DnaA-ATP, par la liaison préférentielle des DnaA-ADP au niveau de ces séquences (**Fujimitsu 2009**). Une concentration élevée en DnaA-ATP permet l'initiation de la réplication par la formation d'un filament de DnaA-ATP. Les DnaA-ATP libres, sont hydrolysés par le complexe Hda-ADP ou RIDA (Regulatory Inactivation of DnaA) (**Figure 10BC**). Les formes DnaA-ADP hydrolysées se fixent dans les DARS (**Starstad and Katayama 2013**).

SeqA est une protéine qui régule négativement l'initiation de la réplication. SeqA « séquestre » les origines nouvellement synthétisées en reconnaissant les sites GATC hémiméthylés au cours de la réplication (**Slater 1995**).

Le réplisome est assemblé par la fixation de l'hélicase DnaB grâce à la protéine de chargement DnaC (**Figure 10D**). Ce complexe est ensuite réorganisé par la fixation de DiaA qui interagit avec DnaA : DiaA se fixe au même endroit que DnaB sur DnaA (**Keyamura 2009**). La liaison d'IHF au niveau de l'origine de réplication, de même que d'autres NAPs comme HU et Fis, participe grandement à la formation du complexe d'initiation (**Starstad and Katayama 2013**). DnaC est perdue suite à la liaison de la primase DnaG. La synthèse d'une courte séquence par l'ARN polymérase permet le chargement du Béta-Clamp (complexe protéique de l'ADN Polymérase III) sur le brin Lagging.

Le modèle actuel est que le réplisome de chaque fourche de réplication possède trois ADN Polymérase III, une sur le Lagging peu processive, une autre sur le Leading très processive, et une latente (**McInerney 2007, Reyes-Lamothe 2010**). L'ADN sous forme simple brin est stabilisé par la protéine SSB qui peut être utilisée comme marqueur du réplisome en microscopie à fluorescence (**Reyes-Lamothe 2008**) (**Figure 10E**). Chez *B. subtilis* deux polymérases différentes forment le réplisome, chacune sur le Leading et Lagging (**Sanders 2010**).

La terminaison de la réplication est sujette à discussion. Dans le cas d'une réplication bi-directionnelle comme chez *E. coli*, les deux fourches de réplication se dirigent vers la région Terminale où la réplication est stoppée. Mais comment sont-elles stoppées ? Par une collision des fourches ou un arrêt au niveau de séquences spécifiques sur le chromosome ? Chez *E. coli*, la fin de la réplication est limitée à une zone de 357kb dans la région Terminale, où se trouvent des sites de terminaison de la réplication. Ces sites empêchent les fourches de remonter vers l'origine. Ces sites « Ter » sont reconnus par la protéine Tus qui laisse passer les fourches dans le sens *ori*→*ter* et les bloquent dans le sens *ter*→*ori* (**Figure 20B,C**) (**Hill 1989**). Ces terminateurs sont nombreux dans la région Terminale. Cependant, nous ne savons toujours pas si l'arrêt des fourches aux sites Ter provoque leur désassemblage, ni comment se termine la réplication en dehors de ces sites Ter. La délétion du gène *tus* chez *E. coli* ou de

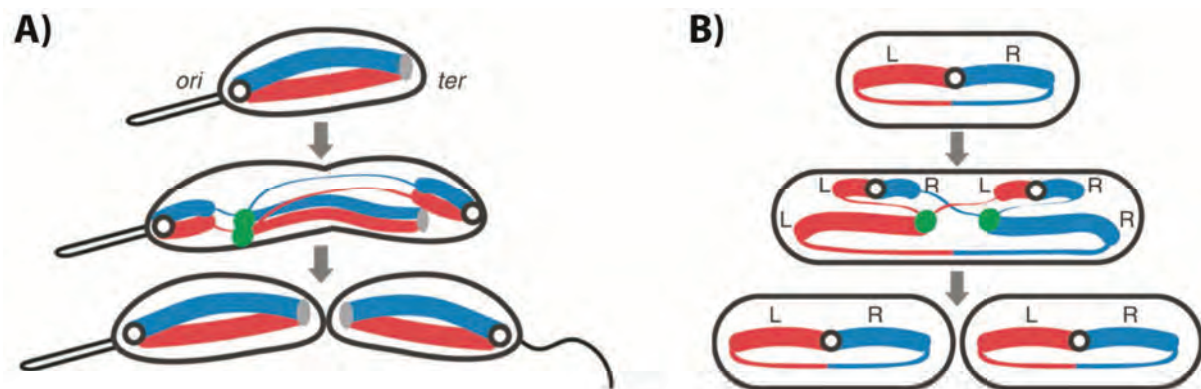


Figure 11 - Dynamique des Réplisomes chez *C. crescentus* et *E. coli*

(A) Organisation Ori/Left-Right/Ter du chromosome chez *C. crescentus* avec des réplisomes mobiles (points vert). **(B)** Dynamique des réplisomes chez *E. coli*. Le chromosome est organisé selon un axe Left/Ori-Ter/Right. La réplication est initiée au centre de la cellule et reste dans cette même région même si les réplisomes sont mobiles.

Adapté de Jackson 2012.

son équivalent *rtp* chez *B. subtilis* ne conduit pas à un phénotype particulier (**Iismaa and Wake 1987, Roecklein 1991**). De même dans une souche où le chromosome d'*E. coli* a été linéarisé au centre de la région terminale, aucun phénotype significatif d'un problème de terminaison de la réplication n'a été observé (**Cui 2007**). La réplication se termine dans la majorité des cas dans la région Terminale, mais on ne sait pas, où, ni comment (collision ou fusion des fourches de réplication). L'hypothèse actuelle serait que la réplication chez *E. coli* se termine dans la zone de changement de biais GC (**Duggin 2008**).

2.2.2-Dynamique spatio temporelle des réplisomes bactériens

Pour comprendre la dynamique des réplisomes, il faut comprendre comment sont organisés les chromosomes dans l'espace cellulaire. Les premières analyses de la dynamique des réplisomes ont été faites chez *B. subtilis* et montraient que la réplication se faisait au centre de la cellule. Les origines nouvellement répliquées étaient ensuite déplacées à une autre position de la cellule de manière à avoir comme organisation du chromosome répliqué, un positionnement Ori→Ter/Ter→Ori (**Lin 1997, Webb 1997, Lemon and Grossman 1998**). Chez *C. crescentus*, les régions Origine et Terminale sont associées au pôle. Lorsque la région Origine est répliquée, la deuxième origine néo-répliquée migre au pôle opposé. La région Terminale reste au contraire centrale donnant aussi une organisation Ori→Ter/Ter→Ori, les régions Left et Right sont localisées longitudinalement (**Jensen 2001, Viollier 2004**) (**Figure 11A**). Chez *E. coli* la réplication est initiée au centre de la cellule avec ensuite un repositionnement séquentiel des deux origines à proximité des pôles de manière à avoir une organisation Left→Ori →Right/Left→Ori→Right. La région Terminale faisant la jonction entre les régions Left et Right ségréguées (**Nielsen 2006, Wang 2006**) (**Figure 11B**).

Chez *E. coli* la dynamique des réplisomes a été étudiée dans différents laboratoires et se décrit comme suit. Après l'initiation de la réplication, les deux fourches de réplication deviennent rapidement mobiles et fonctionnent alors indépendamment l'une de l'autre le long des deux bras du chromosome. Elles peuvent s'éloigner du centre de la cellule et se mouvoir jusqu'aux pôles avant de revenir au centre de la cellule pour la réplication de la région Terminale et la fin de la réplication. Cette étape particulière, juste avant que la région Terminale soit répliquée et migre du nouveau pôle au centre de la cellule, correspond au « Nucléoïde Splitting », caractérisable en microscopie par l'apparition de cellules avec un nucléoïde bilobé (**Bates and Kleckner 2005**).

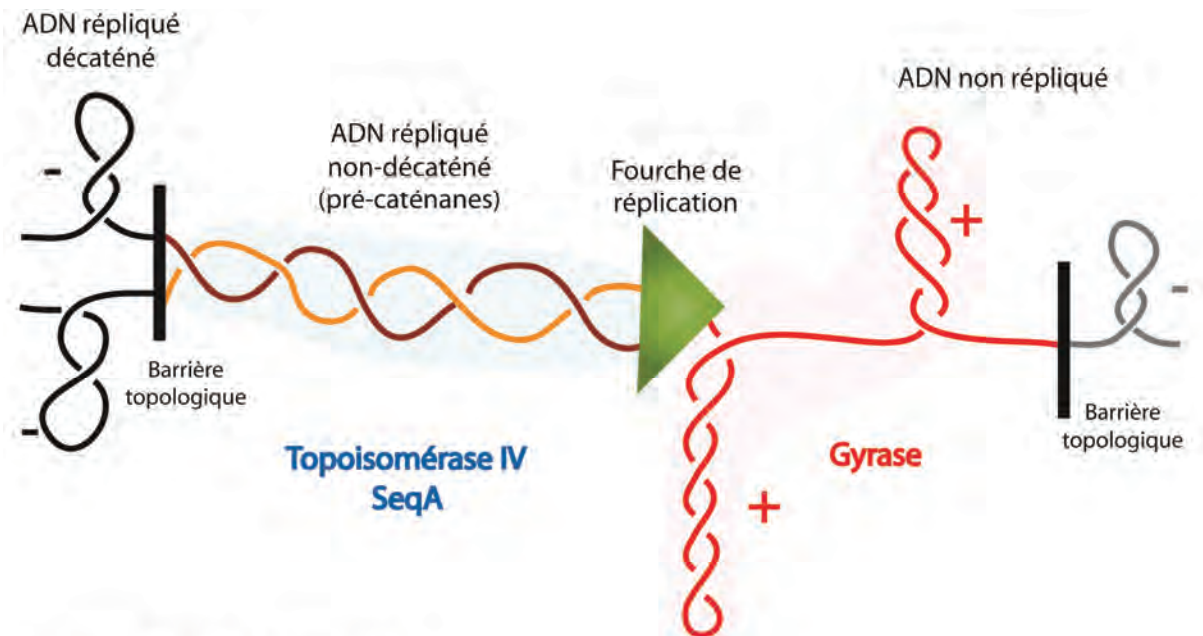


Figure 12 - Topologie réplivative

Représentation des variations de la topologie de l'ADN au cours de la réplication. L'avancée des fourches de réplication (Vert) diminue la super-hélicité négative en avant des fourches de réplication jusqu'à introduire de la super-hélicité positive. La rotation du réplisome et cette contrainte topologique forte en avant des fourches se propage en arrière et entraîne la formation de pré-caténanes. La Gyrase intervient au cours de la réplication pour aider à la résolution de la super-hélicité positive en avant des fourches de réplifications. La Topoisomérase IV intervient principalement durant la période post-réplivative pour résoudre les pré-caténanes. SeqAretarderait l'action de la Topo IV.

Inspiré de Reyes Lamothe 2012, Lesterlin 2012 et Bates and Maxwell 2005

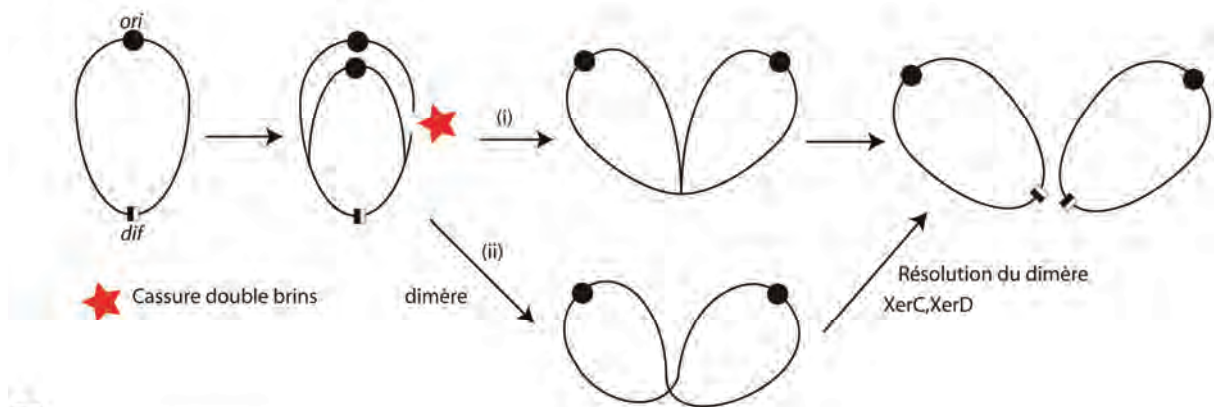
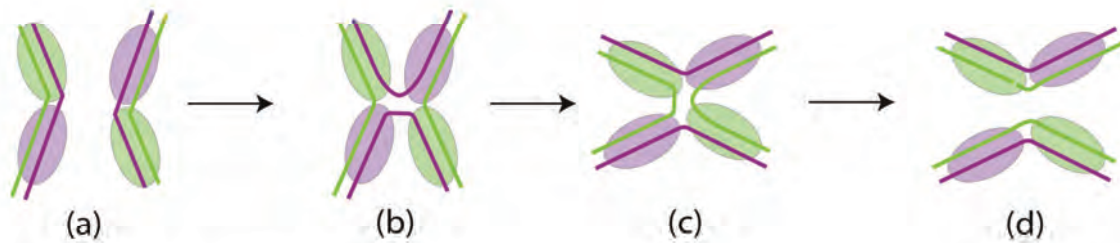
Il a été proposé que chez les bactéries, les réplisomes sont situés en périphérie du nucléoïde de manière à ce que l'ADN néo-répliqué s'enroule autour du nucléoïde : chez *B. subtilis*. Un modèle exotique pour la dynamique du nucléoïde durant la réplication suggère l'enroulement de l'ADN néo-répliqué en périphérie du nucléoïde non répliqué des pôles vers le centre de la cellule (**Berlitzky 2008**).

2.2.3-Perturbations topologiques au cours de la réplication

L'avancée des fourches de réplication modifie la topologie de l'ADN. La progression du réplisome réduit progressivement la super-hélicité négative jusqu'à l'introduction d'une super-hélicité positive en avant des fourches de réplication. La rotation du réplisome ne suit pas le pas d'hélice de l'ADNdb et de ce fait, introduit en arrière des fourches, des pré-caténanes (**Bates and Maxwell 2005**). Lorsque la contrainte topologique est trop forte devant les fourches de réplication, elle se propage en arrière des fourches de réplication pour permettre au réplisome de continuer sa progression.

La super-hélicité positive en avant des fourches de réplication est résolue progressivement et principalement par la Gyrase au cours de la réplication. La Topoisomérase IV assure la plus grande partie de la résolution des pré-caténanes, principalement durant la période post réplivative jusqu'à la fin du cycle cellulaire (**Figure 12**) (**Hiasa 1994, Zechiedrich 1995**). La topologie réplivative implique donc ces deux topoisomérases ont des activités complémentaires : la Gyrase étant la plus active au cours de la réplication, la Topo IV après la réplication.

La Topo IV, en intervenant dans la résolution des pré-caténanes et caténanes, aide à la séparation des chromosomes frères et conduit à la ségrégation progressive des copies (**Cf Partie 2.3**). La topoisomérase IV est constituée de deux sous unités ParC et ParE qui forment un hétéro-tétramère en forme active. L'activité de la Topo IV est régulée spatio-temporellement (**Madabhushi 2009**). Il a aussi été montré qu'une interaction physique entre la Topo IV et certains acteurs protéiques existe, comme avec FtsK, SeqA ou MreB (**Espeli 2003, Madabhushi 2009**).

A)**B)****C)****Figure 13 - Dimères de chromosome**

(A) Formation d'un dimère de chromosome au cours de la réplication. Après une cassure double brins, la réparation par recombinaison homologue de cette cassure mène à la formation d'une jonction de Holliday (JH). Une fois la JH résolue un dimère de chromosome peut être formé (ii). Cette structure est résolue en fin de cycle cellulaire par les recombinases XerC et XerD au site *dif*. **(B)** Structure du site *dif*. Chaque recombinase XerC et XerD se fixe sur une moitié du site *dif* (vert et violet) de chaque côté de la séquence coeur centromérique. **(C)** Recombinaison XerCD/*dif*. La recombinaison entre deux sites *dif* (a) s'effectue en différentes étapes. La formation d'une jonction de Holliday (b et c) est un intermédiaire nécessaire pour la résolution du dimère de chromosome en deux monomères (d).

2.2.4-Dimères de chromosomes

En cas de cassure double brins en amont des fourches de réplication, un dimère de chromosome peut être formé (**Figure 13A**). Les dimères de chromosome sont résolus en fin de cycle cellulaire au niveau du site *dif* qui se situe dans la région Terminale du chromosome (**Figure 13B**) (Cf Parties 3.1.2 et 3.1.4). Les recombinaisons XerC et XerD se fixent au niveau de ce site *dif* et permettent les échanges de brins nécessaires pour la résolution du dimère. La formation d'une jonction de Holliday est nécessaire pour résoudre le dimère de chromosome (**Figure 13C**). En une génération, on estime à 15-20% le pourcentage de formation de dimères de chromosome, qui sont résolus par les recombinaisons XerC et XerD (**Péraux 2000**). La non résolution d'un dimère de chromosome conduit à un phénotype de filamentation : un dimère de chromosome ne peut pas être ségrégué équitablement dans les deux futures cellules fille. L'ADN reste au centre quand le septum se forme, ce qui le coupe (guillotine) et induit le système SOS. Celui-ci va alors bloquer le processus de septation mais pas l'élongation de la cellule, d'où la formation de filaments.

2.3-Cohésion post-réplivative

Chez les eucaryotes, la cohésion est l'étape qui empêche la séparation des chromatides sœurs jusqu'à ce qu'elles soient toutes orientées selon le même axe, une fois que la réplication est terminée. Chez les procaryotes, la cohésion correspond à la période de contact entre deux régions qui viennent d'être répliquées, jusqu'à ce qu'elles soient ségréguées (**Figure 14A**).

Tous les *loci* du chromosome disposent d'une durée de cohésion de quelques minutes, induit par le changement de topologie en arrière des fourches de réplication (**Reyes Lamothés 2008**). Cette durée de cohésion dépend du timing de résolution des pré-caténanes par la Topoisomérase IV. La cohésion post-réplivative est universelle pour tous les *loci* répliqués et la résolution de cette cohésion est progressive de la région Origine vers la région Terminale (**Nielsen 2006, Wang 2006**).

Cependant, certaines régions comme la région Origine avec les SNAPS (Cf Partie 2.4.3) et la région Terminale, disposent d'une période de cohésion étendue qui ne dépend pas seulement de la résolution des pré-caténanes (**Figure 14A**) (**Lesterlin 2012**). La cohésion étendue de la région Origine aurait pour origine l'accumulation de la protéine MukB qui condenserait préférentiellement cette région du chromosome (**Sunako 2001, Li 2003, Lau**

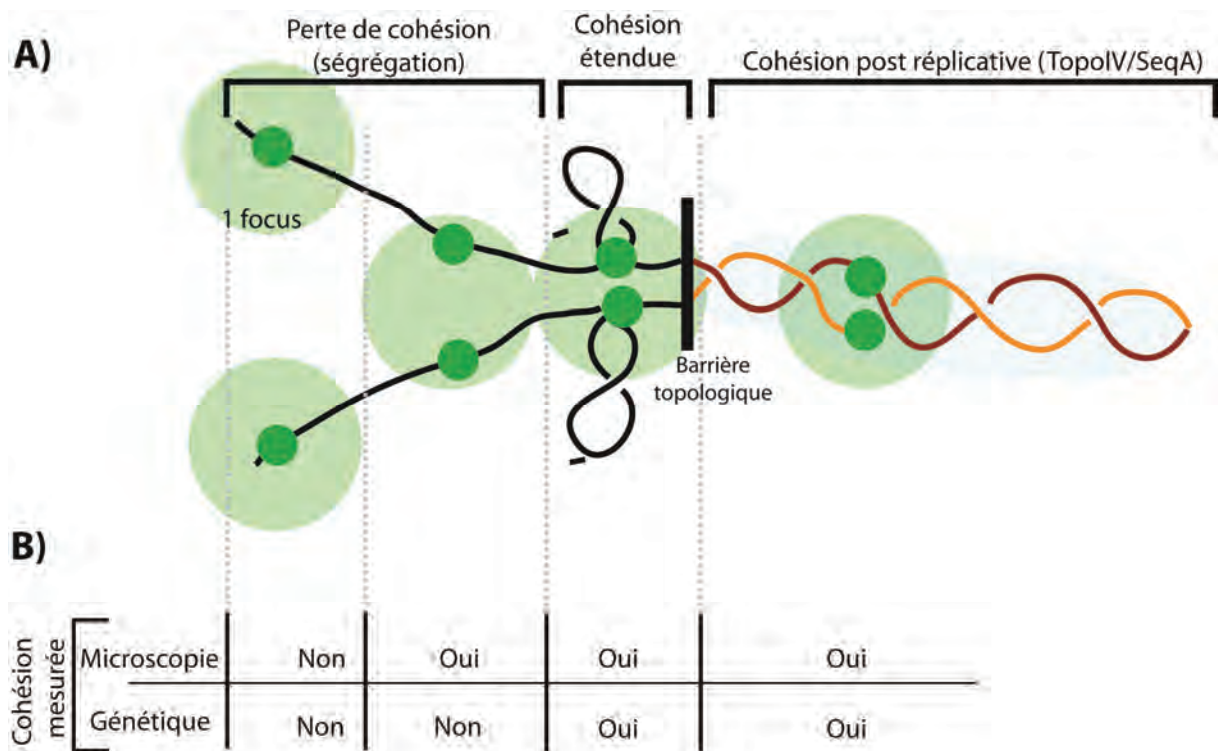


Figure 14 - Cohésion Post-Réplivative

(A) La cohésion post réplivative est commune à tous les *loci* répliquées. et dépend de la présence de SeqA et de l'activité de la Topo IV. Quand les pré-caténanes sont résolus, cette cohésion est perdue sauf pour certaines régions (SNAPs, région Terminale) où elle est étendue. Elle correspond à la période de cohésion non topologique sur la figure. En vert foncé sont représentés deux *loci* pendant et après la cohésion ainsi que le rayon imagé de la localisation de tels *loci* en microscopie à fluorescence. **(B)** Différences entre la cohésion mesurée par des outils de recombinaison intermoléculaire et via la microscopie, de manière à mettre en avant les limites de la microscopie en vert clair qui représente la résolution de la microscopie à fluorescence.

Adapté de Lesterlin 2012, Joshi 2013

2003, partie I introduction). Cependant certains travaux tendent à suggérer que la cohésion étendue de la région Origine ne dépendrait pas de MukB, mais d'autres facteurs à décrire / préciser (**Adashi 2008**). La cohésion étendue de la région Terminale est encore mal comprise. La protéine MatP est responsable de l'organisation de la région Terminale en un Macro-Domaine (**Mercier 2008, Partie introduction I MacroDomaine**), mais des travaux récents montrent que la cohésion étendue de la région Terminale ne dépendrait pas de MatP (**Lesterlin 2012**).

2.3.1-Différentes mesures de la cohésion

La période de cohésion d'un *locus* donné peut être mesurée de deux manières différentes. Via des outils de recombinaison inter-chromosomique, on peut mesurer le taux d'interaction physique entre deux *loci* en cohésion (**Lesterlin 2012**). Cette mesure de la cohésion est précise. Via la microscopie à fluorescence, on est limité par la résolution du microscope (200nm pour un champ large), qui tend à augmenter le temps de cohésion (**Figure 14B**). En microscopie à fluorescence, quand on regarde une cellule avec un *focus*, le diamètre de ce *focus* est large et englobe aussi les *loci* à proximité. Ainsi, quand on observe un *focus*, il y a parmi le nombre de cellule avec un *focus*, un certain nombre de cellules qui disposent en fait de deux *loci* co-localisés en cours de ségrégation (**Figure 14A**). De ce fait les tests de recombinaison génétiques sont les plus précis pour la mesure de cohésion réelle d'un *locus* puisque relevant vraiment de l'interaction physique entre les deux copies cohésives.

2.3.2-Acteurs et modèle actuel

Il est important de noter que la perte de la cohésion ne semble pas suivre le même profil selon les conditions de croissance. Si en condition lente de croissance, la cohésion est peu dépendante de la réplication, en condition rapide de croissance, la durée de cohésion est courte (**Nielsen 2007, Adashi 2008**). La durée de cohésion de la région Origine serait plus importante que celle de la région Terminale en condition lente de croissance (**Reyes-Lamothe 2008**).

La Topoisomérase IV est l'un des acteurs principaux responsable de la cohésion post répllicative. En l'absence de Topo IV (mutant *parC* ou *parE* thermosensible), la durée de cohésion des *loci* dans la région Origine augmente nettement (doublement), suggérant que c'est la présence des pré-caténanes qui maintiendrait les deux copies néo-répliquées ensemble

(Wang 2008). Comme précisé précédemment, la durée de cohésion de la région Origine est étendue. La faible activité de la Topo IV au début de réplication ne permettrait pas de résoudre immédiatement tous les pré-caténanes dans la région Origine. De ce fait, la régulation spatio-temporelle de l'activité de la Topo IV serait responsable de la cohésion de la région Origine (Lesterlin 2012).

La cohésion post-réplivative permettrait de laisser à certains mécanismes le temps de se produire. La cohésion générale à tous les *loci* facilite la réparation en cas de dommage à l'ADN. La cohésion étendue de la région Origine permettrait d'organiser le nucléoïde dans une certaine conformation (Joshi 2011). Celle de la région Terminale permettrait de résoudre toutes les contraintes topologiques qui se sont accumulées en fin de réplication et aussi de permettre la résolution des dimères de chromosomes.

Certains *loci* sur le chromosome ont été caractérisés comme ségrégeant plus tard que des *loci* répliqués plus tard qu'eux. Deux régions d'environ 150 kb (SNAP1 et SNAP2) situées dans la région Origine sur le même bras chromosomique, possèdent une cohésion étendue. On ignore l'origine de cette cohésion étendue mais elle permettrait, lorsqu'elle est relâchée, de provoquer le Nucléoïde Splitting (bilobage du nucléoïde décrit précédemment). La perte de cohésion de ces deux régions s'annonce comme étant une étape importante entre la ségrégation séquentielle des Origines, et la réplication de la région Terminale qui migre alors du nouveau pôle au centre de la cellule. Les acteurs et mécanismes responsables de ce prolongement de cohésion restent à décrire (Bates and Kleckner 2005, Joshi 2011, Fisher 2013).

Récemment, des travaux ont montré que la cohésion post-réplivative aurait pour origine la présence de SeqA sur les régions néo-répliquées et cette présence retarderait la résolution des liens d'inter-caténation par la Topoisomérase IV (Joshi 2013).

2.4-Ségrégation des chromosomes

La ségrégation des chromosomes permet de répartir équitablement le matériel génétique dans les deux futures cellules filles. Ce mécanisme est une étape essentielle et contrôlée, et chez les bactéries, s'effectue en concomitance avec la réplication et la perte de cohésion.

L'organisation du nucléoïde a pour origine le processus de ségrégation. Chez *E. coli* et avant l'initiation de la réplication, le nucléoïde est organisé avec la région Origine au centre de la cellule et la région Terminale au pôle qui vient de se diviser (nouveau pôle). Le

mécanisme de ségrégation permet : (i) la migration des origines néo-répliquées du centre aux futures positions centrales des cellules filles (soit les positions $\frac{1}{4}$ et $\frac{3}{4}$ de la cellule en cours de division), (ii) le positionnement des régions Left et Right suivant un profil particulier de localisation et (iii), la séparation de la région Terminale qui reste au centre de la cellule jusqu'à la toute fin du cycle cellulaire.

La ségrégation des copies néo-répliquées du chromosome ne peut se faire que si les liens topologiques entre les deux copies d'une même région ont été résolus. On estime qu'un lien topologique doit être résolu tous les 10 pb. Ces liens comme précisé plus haut sont majoritairement résolus par la Gyrase devant les fourches de réplication. Cependant la vitesse de résolution des super tours positifs par la Gyrase est insuffisante pour garder une topologie constante. La contrainte topologique qui s'accumule en avant des fourches qui se propage en arrière par la formation de pré-caténanes, est responsable en partie de la cohésion post-répllicative et est résolue par la Topoisomérase IV (**Cf Partie 2.3**). Les caténanes qui sont formés une fois la réplication terminée, ne peuvent être résolus qu'en fin de cycle cellulaire par la Topo IV (**Wang 2008**). De même, la résolution des dimères des chromosomes en toute fin de cycle est une étape essentielle pour la terminaison de la ségrégation des chromosomes.

2.4.1-Ségrégation du chromosome d'*E. coli*

Le chromosome de cette bactérie est ségrégué progressivement d'*ori* vers *ter* en concomitance avec le mécanisme réplcatif et cohésif. Cependant, aucun véritable acteur global de la ségrégation du chromosome d'*E. coli* a été identifié jusqu'à présent. Des acteurs agissant sur la topologie de l'ADN (Topo IV), dans la condensation du chromosome (MukBEF), dans le maintien de l'enveloppe cellulaire (MreB), et dans la résolution des dimères de chromosomes (XerCD/*dif*), ont été décrits comme ayant une influence sur la ségrégation du chromosome d'*E. coli*, soit par une surexpression ou une délétion du / des gène(s) codant pour ces acteurs.

La rapidité avec laquelle les origines sont ségréguées chez *E. coli* suggère la présence d'un mécanisme actif de ségrégation. Or aucun n'a été répertorié jusqu'à présent. La région qui entoure l'origine de réplication est une région qui possède de nombreux gènes transcrits activement durant la réplication, ce qui en fait le centre névralgique des ARN polymérases et ARNr. Les ARN polymérases pourraient permettre la ségrégation des régions Origines : l'accumulation de protéines aux origines de réplication exclue la présence d'autres molécules à proximité et faciliterait la ségrégation de ces régions (**Dworkin 2002, Rocha 2008**).

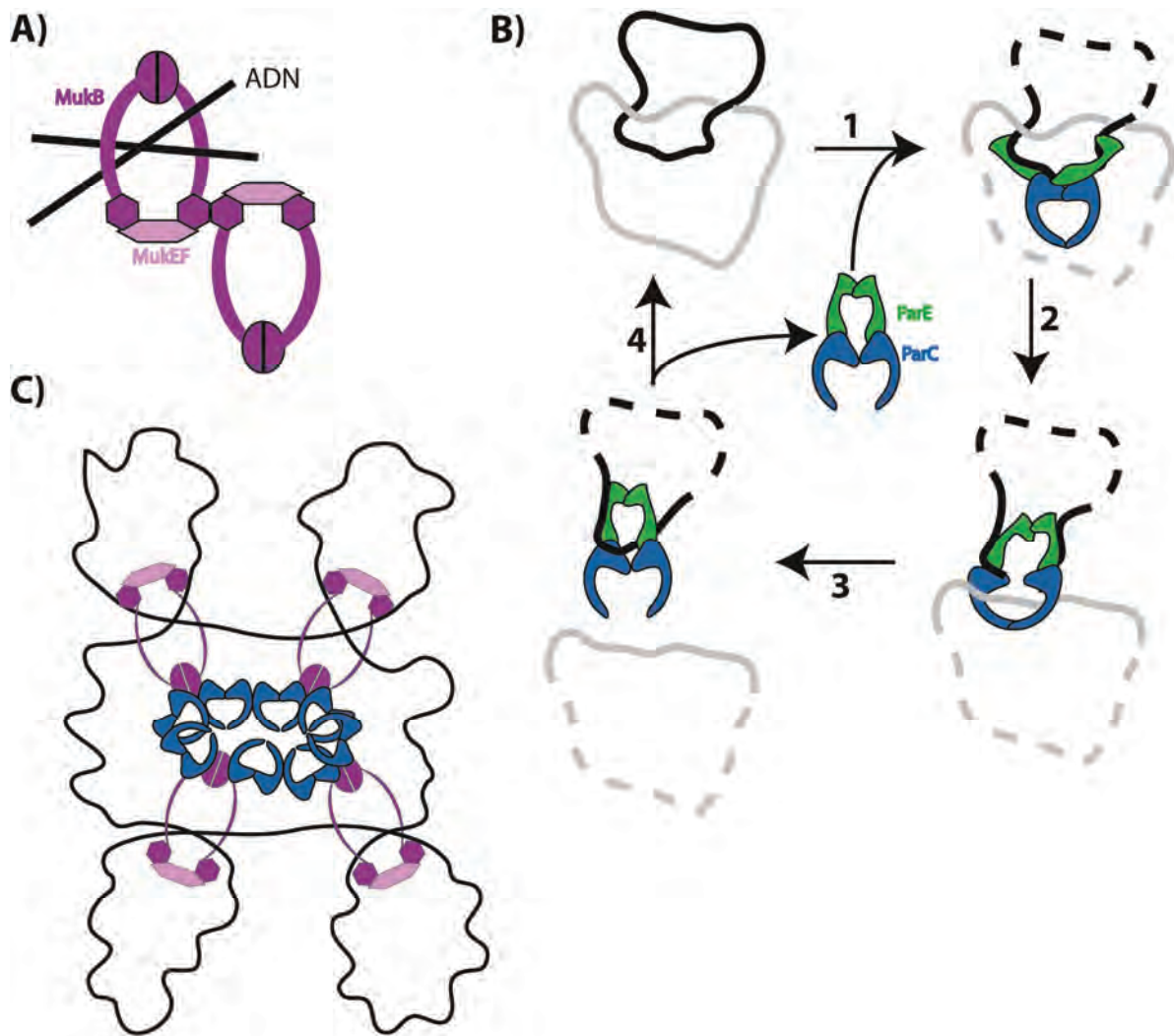


Figure 15 - MukBEF et TopoIV

(A) Principe de la condensation induite par MukBEF avec l'interaction entre deux complexes Muk. Les deux brins d'ADN appartiennent à la même molécule. (B) Résolution d'un caténane par la Topoisomérase IV constituée des sous unités ParC et ParE, chacune en dimère. L'ADN double brin de la molécule en noire est cassé pour permettre la résolution du caténane. (C) Hypothèse de la régulation spatio-temporelle de l'activité de la Topo IV. Les sous unités ParC seraient séquestrées par la formation d'un complexe condensé des protéines MukBEF.

Inspiré de Bates 2010 et Li 2010

Cependant, comme l'activité dans les complexes d'ARNpol dépend du cycle cellulaire (**Figure 6**), la ségrégation des Origines doit se faire par d'autres moyens en condition lente de croissance.

Une séquence particulière chez *E. coli* a été identifiée comme étant importante pour la localisation des origines après ségrégation (**Yamaichi 2004**). Cette séquence *migS* de 25pb est localisée à 200kb de l'origine *oriC*. Elle serait la première région à être ségrégée du centre de la cellule aux positions $\frac{1}{4}$ et $\frac{3}{4}$, avant l'origine de réplication *oriC*. En effet, même si *oriC* est répliqué avant *migS*, cette dernière est ségrégée en premier. Si *migS* sert à positionner les régions Origines, un mutant *migS*⁻ ne présente pas un phénotype différent du sauvage au niveau de la ségrégation du reste du chromosome. De ce fait, *migS* n'est pas une séquence centromérique liée à un système de ségrégation Par (**Fekete 2005**). La localisation des origines aux positions $\frac{1}{4}$ et $\frac{3}{4}$ aurait pour origine un mécanisme qui reste encore à décrire.

Les protéines de condensation du nucléoïde MukBEF chez *E. coli* (SMC chez *B. subtilis*), ont longtemps été décrites comme étant impliquées dans la ségrégation des chromosomes (**Figure 15A**). Un mutant *mukBEF*⁻ produit 10 à 15 % de cellules anucléées et est thermosensible pour sa croissance et la ségrégation est altérée dans de telles conditions (**Niki 1991**). L'organisation du chromosome est modifiée : l'organisation circulaire Left-Ori/ter-Right deviendrait longitudinale Ori-Left/Right-Ter (**Danilova 2007, Badrinarayanan 2012**). Chez *B. subtilis* les SMC sont localisées dans les régions Origine via la présence du complexe de ségrégation ParABS (**Cf Partie 2.4.3**), mais on ignore chez *E. coli* comment MukB localise dans les régions Origine vu qu'il n'y a pas de système Par (**Sullivan 2009**). A ce jour, le mécanisme d'action de MukBEF sur l'ADN n'est pas clairement décrit : on ne sait pas comment MukBEF se lie à l'ADN dans les régions Origine et en dehors.

L'hypothèse actuelle pour expliquer le rôle de MukBEF dans la ségrégation des chromosomes serait que MukBEF modulerait l'activité spatio-temporelle de la Topoisomérase IV (**Figure 15B**) (**Espeli 2003a, Stewart li 2010, Hayama 2010**). Chez les eucaryotes la condensine et la topoisomérase de type II interagissent aussi, suggérant l'importance de l'interaction entre ces deux acteurs (**Bhat Philip Glover 1996**). MukB et la sous-unité ParC interagiraient entre elles, mais contre toute attente, elles ne sont pas localisées au même endroit : MukB se retrouve globalement sur tout le chromosome alors que la Topo IV est localisée au niveau des fourches de réplication. Une régulation spatio temporelle de l'activité de la topoIV pourrait expliquer une interaction temporaire entre ces deux acteurs (**Espeli 2003b**). Chez *E. coli*, MukB stimulerait l'activité de la TopoIV en séquestrant les sous unités ParC (**Figure 15C**), comme chez *B. subtilis* où une sur-expression

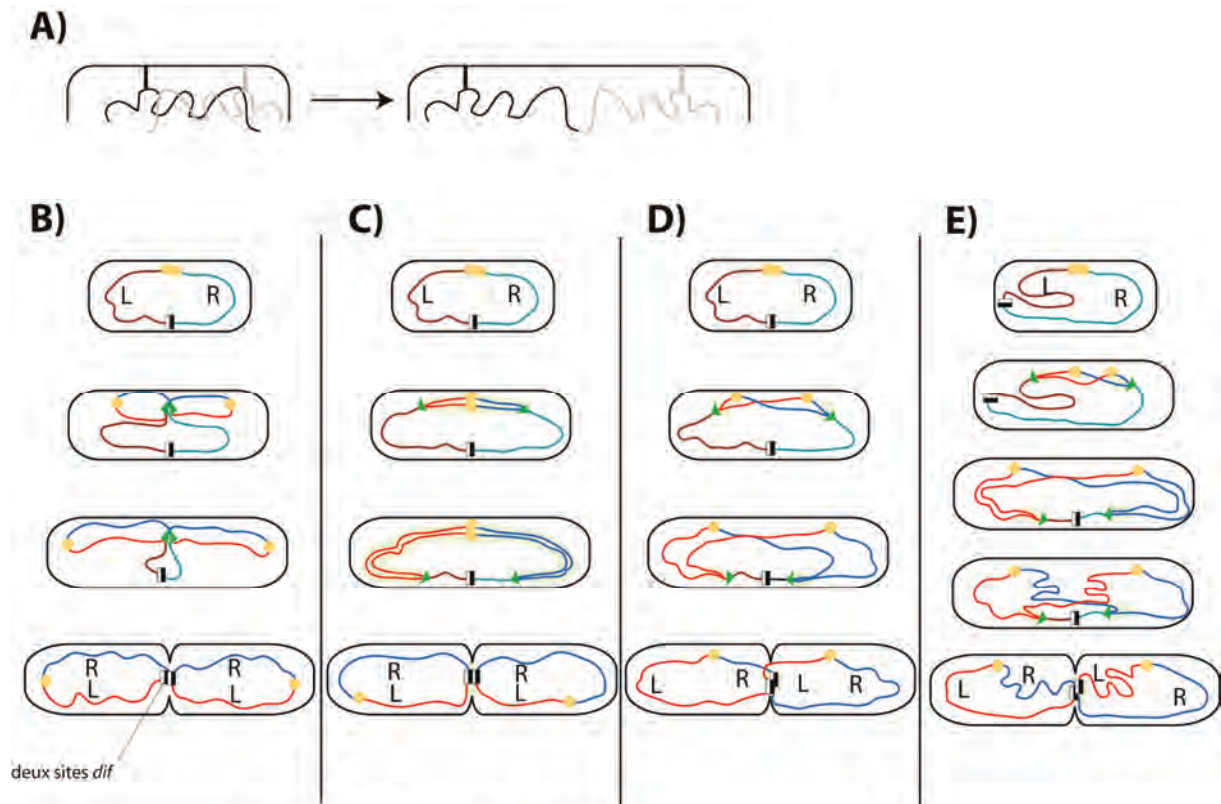


Figure 16 - Modèles de ségrégation chez *E. coli*

Les L et R représentent l'organisation des régions Left et Right du chromosome. Les origines sont représentées en cercle jaune, les fourches par des triangles verts, les réplicores en marron et bleu ciel et l'ADN néo-répliqué en bleu foncé et rouge. Le site *dif* est indiqué par un rectangle blanc et noir. **(A)** Modèle de ségrégation de Jacob par l'élongation des cellules et l'attachement des chromosomes aux membranes. **(B)** Modèle de ségrégation "Replisome Factory" de Lemon et Grossman. C'est la force des réplisomes qui guide la ségrégation. **(C)** Modèle de ségrégation "Sister Chromosome Cohesion" où la cohésion de tous les loci est perdue en une seule fois. **(D)** Modèle de ségrégation "sister loci cohesion" de Nielsen où la perte de la cohésion est progressive et en concomitance avec la réplication. **(E)** Modèle de ségrégation adopté par la communauté. La ségrégation des *loci* s'effectue de manière asymétrique et à des positions spécifiques dans la cellule de manière à ce que l'une des régions répliquées reste à la position pré-ségrégative dans sa moitié cellulaire et que l'autre soit ségrégée dans l'autre moitié cellulaire.

Adapté de Nielsen Ph.D Thesis

de la Topo IV restaure un phénotype *wt* dans une souche *smc*- (**Tadesse 2005**). L'effet de MukBEF sur l'activité Topo IV est sujet à discussion : d'une part parce que la localisation de ces acteurs est différente au cours du cycle, ce qui leur laisse une fenêtre de temps courte pour interagir, mais aussi parce que l'activité de la Topo IV est régulée par d'autres acteurs importants du cycle cellulaire comme FtsK, MreB et SeqA (**Espeli 2003ab, Kang Han 2003, Madabhushi 2009**). Il est alors difficile de se représenter comment, où et quand ces acteurs interagissent avec la Topo IV pour moduler son activité.

2.4.2-Modèles de ségrégations des chromosomes chez *E. coli*

Le tout premier modèle de ségrégation des chromosomes bactériens a été pensé dans les années 60 et a perduré pendant plusieurs années (**Jacob 1963**). L'idée reposait sur le fait que l'élongation des membranes entraînait la ségrégation des origines et du reste du chromosome (**Figure 16A**). Cependant, plusieurs travaux ont montré plus tard que la vitesse de ségrégation des origines est plus rapide que la vitesse d'élongation de la cellule, suggérant ainsi que ce modèle n'est pas possible.

Le modèle suivant pour expliquer la force de ségrégation du chromosome a été proposé dans les années 70 (**Dingman 1974**), mais n'a été précisément décrit que bien plus tard (**Lemon and Grossman 1998**). Ce modèle, appelé « Replisome Factory » chez *B. subtilis*, propose que les forces nécessaires pour la ségrégation des chromosomes sont fournies par les fourches de réplication qui en étant liées l'une à l'autre au centre de la cellule de manière à ne pas se déplacer sur l'ADN, disposent de suffisamment de force pour pousser l'ADN loin du septum (**Figure 16B**).

Un autre modèle paru chez *E. coli* à cette même période s'oppose à celui de Lemon et Grossman (**Hiraga 2000, Sunako 2001**). Nommé « Sister Chromosome Cohesion », il repose sur le maintien d'une cohésion entre les deux copies néorépliquées du chromosome. Cette cohésion est relâchée de manière globale, une fois la réplication de tout le chromosome terminée (**Figure 16C**). Dans ce modèle les fourches de réplication ne sont pas fixées au centre de la cellule, et leur mobilité est réduite aux limites membranaires.

Suite à l'utilisation de systèmes de marquages de *loci* chromosomiques plus précis comme les systèmes ParB/*parS* (**Figure 30B**), le modèle « sister *loci* cohesion » a été décrit. C'est un modèle où la notion de relâchement progressif de la cohésion a été introduite. En cela, il diffère du modèle d'Hiraga et Sunako. Les fourches de réplication sont toujours mobiles sauf que la ségrégation intervient progressivement en concomitance avec la

réplication. Dans ce modèle tous les *loci* possèdent le même délai de cohésion dont le rôle est de permettre les réparations en cas de cassures double brins après le passage des fourches de réplication. Les *loci* sont tous deux ségrévés en même temps et la région Terminale serait la dernière région à être ségrévée (Nielsen 2006a,b) (Figure 16D).

Le dernier modèle historique est celui qui a été le plus documenté. C'est le modèle « Home and Away » qui est très similaire au modèle « sister *loci* cohesion » avec la concomitance des mécanismes de réplication et ségrégation. Sauf qu'ici, les deux *loci* néo-répliqués ne sont pas ségrévés en même temps et de la même manière. L'un reste à la position pré-ségrégative (home *locus*) tandis que l'autre est ségrévé dans l'autre moitié cellulaire (away *locus*) (Wang 2005, Nielsen 2006) (Figure 16E). Ce modèle a été complété au fur et à mesure par divers travaux : les réplisomes chez *E. coli* et de nombreuses autres bactéries sont mobiles et une période de cohésion post-réplivative obligatoire entre les *foci* néo-répliqués est toujours retrouvée chez les bactéries.

On peut, à partir de travaux qui ont été publiés depuis 2006, présenter un modèle pour la ségrégation du chromosome chez *E. coli* (Figure 16E). Le chromosome est organisé avec une orientation *Left*→*ori*→*Right* et la région Terminale relierait les régions Left et Right d'un pôle à l'autre de la cellule. Avant réplication, les régions Left et Right sont chacune dans une moitié cellulaire, et les régions Ter et Ori sont respectivement en périphérie et au centre de la cellule. La réplication est initiée au centre de la cellule. Après une période de cohésion, les régions Origines sont ségrévées séquentiellement.

Après que la première région Origine ait été ségrévée en direction du vieux pôle, l'autre origine, restée au centre, est ségrévée en direction du nouveau pôle de manière à avoir une localisation des deux origines aux positions $\frac{1}{4}$ et $\frac{3}{4}$ de la cellule. Cette ségrégation de la deuxième origine interviendrait lors du bilobage du nucléoïde. Avant ce bilobage, les fourches de réplication s'éloignent du centre de la cellule pour répliquer progressivement les régions Left et Right du chromosome. Ces régions sont ségrévées de manière asymétrique et à des positions spécifiques dans la cellule, de manière à ce que l'une des régions répliquées reste à la position pré-ségrégative dans sa moitié cellulaire, et que l'autre soit ségrévée dans l'autre moitié cellulaire. Une fois les régions Left et Right répliquées, les fourches de réplication reviennent au centre la cellule où la deuxième origine est ségrévée avec les régions Left et Right, et où la région Terminale non répliquée migre du nouveau pôle au centre pour être répliquée puis ségrévée (Figure 16E). Dans ce modèle la force de ségrégation qui permet la migration home → away est inconnue. La particularité de ce modèle est la ségrégation LRLR (Left→Right / Left→Right) (Wang 2006, Nielsen 2006). La ségrégation LRLR est conservée d'une cellule mère à ses cellules filles, mais s'il y a un retard de réplication conséquent d'un

groupe de *loci* sur un bras du chromosome (par exemple comme une pause répliquative), l'orientation LRLR change en LRRL ou RLLR. L'orientation LRLR semble liée à la réplication (**Reyes-Lamothe 2008, White 2008, Liu 2010**).

Très récemment, un dernier modèle a été décrit. Certaines expériences récentes tenant compte de la physique particulière du nucléoïde, ont permis de compléter ce modèle (**Figure 16E**) pour expliquer l'origine des forces de ségrégation du chromosome d'*E. coli*.

Le modèle « Tether Segregation » repose sur l'analyse en haute définition et en temps réel de la dynamique du nucléoïde d'*E. coli* (nommé 4D) à différentes étapes du cycle cellulaire (**Fisher 2013**). Le nucléoïde possède une dynamique particulière durant tout le cycle cellulaire et son allongement peut être divisé en quatre principales étapes (T1, T2, T3 et T4, **Figure 17**). Il a été observé que « l'élongation » du nucléoïde se fait en quatre grands pulses avec en moyenne une augmentation de la longueur du nucléoïde de 200 nm à chaque fin de pulse. Il s'avère qu'à chaque fin de pulse, le nucléoïde se re-compacte durant une courte période avant que l'élongation du pulse suivant commence, suggérant une réorganisation et donc compaction du nucléoïde après chaque pulse. En corrélant ces observations avec la dynamique de *loci* chromosomiques dans la région Origine et la région Terminale, ainsi qu'avec l'observation du bilobage du nucléoïde, décrits précédemment (**Bates and Kleckner 2005, Joshi 2011**), on peut définir quatre étapes dans l'allongement et la dynamique du nucléoïde au cours du cycle cellulaire (**Figure 17**) :

→Étape T1 (Pré et Post T1). L'origine est répliquée et les deux régions origines néo-répliquées sont cohésives.

→Étape T2 (Pré T2). L'une des origines reste à la position centrale de la cellule pendant que l'autre est ségrégée vers le vieux pôle. Au cours de cette étape, tous les *loci* de la région Origine ne sont pas ségrégés : les SNAPs restent cohésifs (violet sur la figure). (Post T2) La région Terminale migre du nouveau pôle au centre de la cellule pour y être répliquée tandis que l'origine au centre de la cellule migre en direction du nouveau pôle une fois les SNAPs ségrégés. Cette étape est significative dans l'organisation du nucléoïde et marquée par une augmentation nette du nombre de cellules avec un nucléoïde qui est séparé en deux.

→Étape T3 (Pré et Post T3). La séparation des nucléoïdes se prononce encore plus avec la présence d'un fin filament entre les deux nucléoïdes qui correspond à la région Terminale en cours/fin de réplication. La région Terminale commence alors à être ségrégée ; les deux nucléoïdes (sauf la région terminale) sont déjà à leur position définitive et la formation d'un septum commencée.

→Étape T4. La région Terminale est entièrement ségrégée et le septum pratiquement fermé.

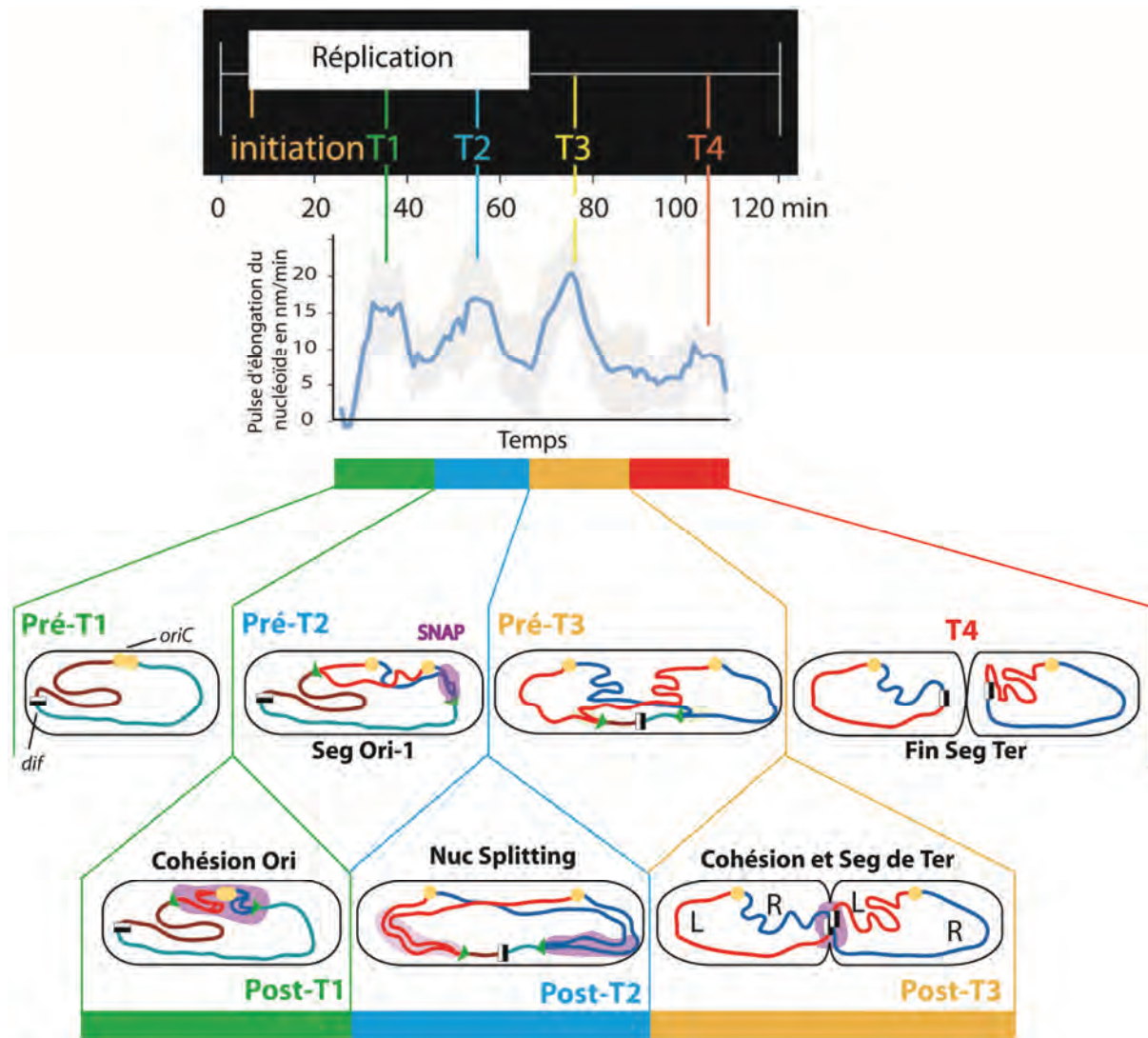


Figure 17 - Modèle "Tether Segregation".

L'analyse de l'élongation du nucléoïde est marquée par quatre grands pulses d'élongation qui sont précédés par une légère diminution de taille du nucléoïde qui se recompacte. Dans ce modèle, la ségrégation s'effectue en quatre principales étapes. Dans un premier temps (vert) les origines sont répliquées mais non ségrégées, la cohésion étant marquée en violet. Puis (en bleu) une première origine est ségrégée tandis que l'autre reste au centre avant que (Post-T2) la deuxième ne migre à son tour. Est représentée en violet la cohésion étendue des SNAPs dans la région Origine, qui lorsqu'elle est perdue mène au Nucleoïde Splitting (bilobage du nucléoïde) et à la migration de la région Terminale au centre de la cellule pour y être répliquée. Les régions Left et Right sont ensuite ségrégées (en Jaune) et la région Terminale qui a terminé d'être répliquée commence à être ségrégée (Post-T3). Enfin, la région Terminale est ségrégée entièrement et la septation est terminée (T4, en rouge).

Adapté de Fisher 2013

Ces étapes reposent sur la présence d'attaches (tether) qui lient les deux nucléoïdes dans l'espace radial et longitudinal. Ces attaches sont limitées et nécessiteraient plus de force pour être ségréguées que le reste des régions du chromosome. Ces attaches peuvent avoir diverses origines dont l'une des principales peut être l'accumulation d'un encombrement spatial dans une région particulière à une étape particulière du cycle comme au niveau des SNAPs et du Macro-Domaine Ter. Lorsque les attaches sont perdues, la tension dans ces régions est abruptement relâchée. Ces attaches seraient responsables de la cohésion étendue décrite précédemment. Elles libèreraient la force nécessaire à la ségrégation des régions intermédiaires puis du reste du chromosome. Ce modèle peut s'adapter aux différents modèles décrits ci dessous comme *B. subtilis* (**Berlatzky 2008**) ou *C. crescentus* (**Umbarger 2011**).

2.4.3-Les systèmes Par chromosomiques

La recherche de l'acteur responsable de la ségrégation des chromosomes chez *E. coli* a conduit de nombreuses personnes à proposer que telle ou telle protéine était responsable de la ségrégation. Cependant, dans des contextes où les gènes codant pour ces protéines ont été supprimés, une ségrégation des chromosomes était encore présente dans la majorité des cellules d'une population. Bien que la réplication et la ségrégation des chromosomes eucaryotes se fassent séparément dans le temps, le mécanisme de ségrégation des eucaryotes peut ressembler aux systèmes de ségrégation des chromosomes chez les bactéries. Les bactéries disposent de trois types de protéines du cytosquelette que l'on retrouve chez les eucaryotes, ce qui implique aussi que même les bactéries sont hautement structurées et organisées comme les eucaryotes (**Fletcher and Mullins 2010, Löwe and Amos 2009**). Les premiers systèmes impliqués dans la ségrégation chez les bactéries furent identifiés dans les années 1980 (**Abeles 1985**).

Les systèmes Par interviennent dans l'organisation des régions Origine chez les bactéries. Ces systèmes sont présents chez 65% des espèces bactériennes et sont similaires aux systèmes de ségrégation qu'on trouve chez les Eucaryotes (dérivés de l'actine et de la tubuline). Sauf chez quelques bactéries comme *Caulobacter crescentus*, ces systèmes ne sont pas essentiels à la ségrégation des chromosomes bactériens. L'analogie entre les systèmes Par et le mécanisme à l'origine de la ségrégation des chromosomes est facile mais faux. Les systèmes Par ont longtemps été supposés comme étant à l'origine des forces nécessaires pour la ségrégation des chromosomes et ce n'est que depuis peu que l'on se rend compte que ces

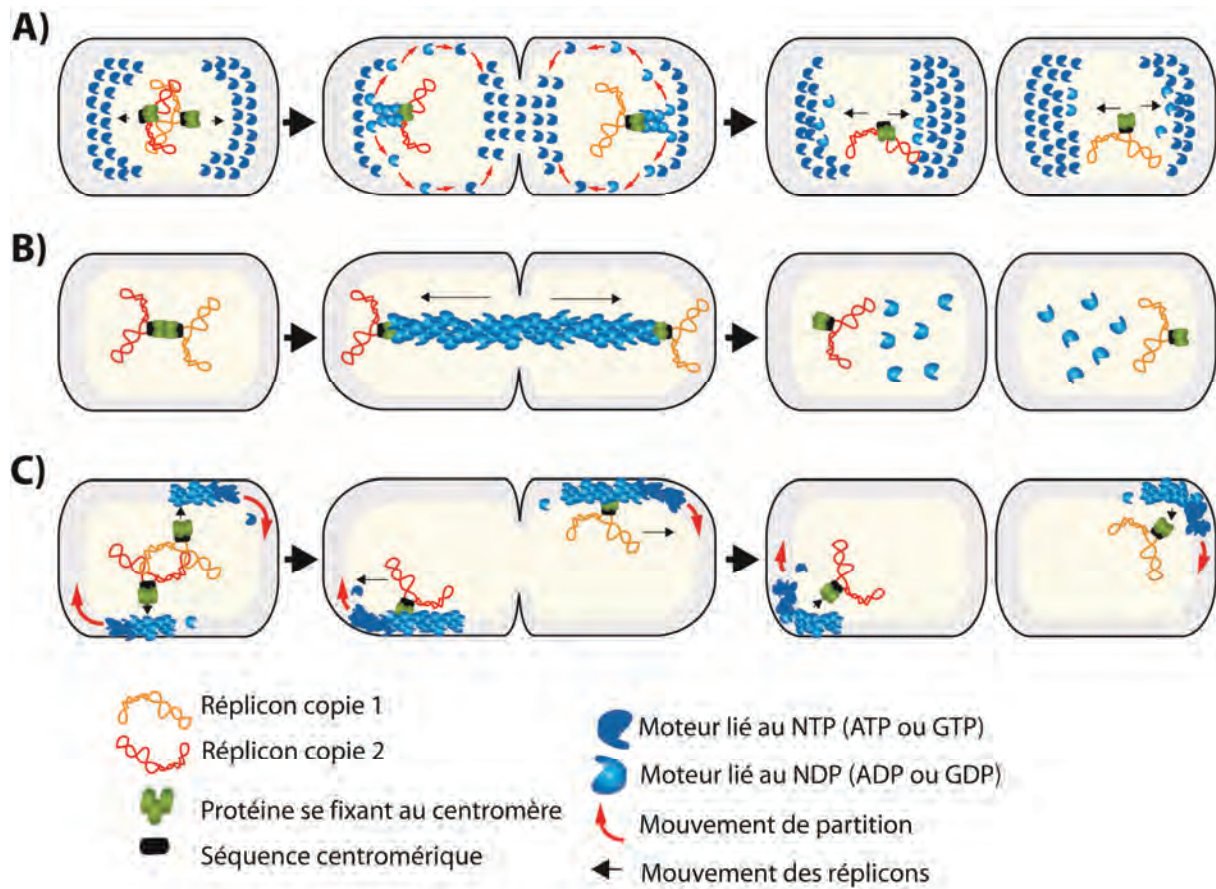


Figure 18 - Les systèmes Par

(A) Système Par de Type I chromosomique et plasmidique. Ils sont présents chez 65% des bactéries disposant d'un système Par. ParA utilise le nucléoïde comme matrice pour ségréger les régions Origine, même si dans la majorité des cas de système Par chromosomique, l'absence de ce système ne conduit généralement pas à un phénotype de ségrégation significatif. **(B)** Système Par de type II pour la ségrégation des plasmides via un mécanisme dépendant de l'actine. **(C)** Système Par de Type III utilisant la tubuline et dédié aux plasmides.

Adapté de Reyes-Lamothe 2012

systèmes Par chromosomiques n'interviennent que dans l'organisation et localisation des régions Origine.

Il existe trois principales familles chez les procaryotes qui permettent d'organiser les régions Origine (Type I – ATPase type WalkerBox) et de ségréger les plasmides (Type II et Type III similaires à l'actine et à la tubuline) (**Figure 18**) (**Gerdes 2000**). Un système Par possède : (i) une séquence qui joue le rôle de centromère, nommée « *parS* », qui est située près du site *ori* (site d'initiation de la réplication) et dont le nombre de *parS* dans la région Origine varie selon les bactéries, (ii) une protéine « ParB » de liaison à l'ADN qui reconnaît spécifiquement la séquence *parS* et qui polymérise l'ADN de part et d'autre du(des) site(s) *parS* et enfin, (iii) le moteur de la ségrégation « ParA », une ATPase qui reconnaît non spécifiquement l'ADN et dont l'activité de polymérisation est contrôlée par le centromère *parS* et qui interagit avec ParB.

→ Le système de type I : Les systèmes ParABS disposent d'une ATPase avec un domaine walker box. Ces systèmes peuvent servir à ségréger à la fois des réplicons plasmidiques et chromosomiques. Les plasmides F (SopABC) et P1 (ParABC) entrent dans cette catégorie. Les bactéries *Vibrio cholerae*, *Bacillus subtilis*, *Caulobacter crescentus*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Burkholderia cepacia* disposent toutes d'un système de ségrégation de type I chromosomique, mais les phénotypes en cas d'absence du système Par sont différents d'une bactérie à l'autre. Le système Par est essentiel chez *C. crescentus*. Seulement 2% des cellules ont une ségrégation anormale chez *B. subtilis* et aucun phénotype de ségrégation chez *Pseudomonas aeruginosa* en l'absence du système Par chez ces bactéries (**Ireton 1994, Vallet-Gely and Bocard 2013**). Ce système Par de type I est celui qui est le plus représenté chez les bactéries disposant d'un système Par (**Livny 2007**). Dans la majorité des cas, les *parS* sont situés à proximité de l'origine de réplication. Les gènes codant pour les protéines ParA et ParB sont situés à proximité des sites *parS* centromériques. Dernièrement, il a été montré que ParA utiliserait le nucléoïde comme matrice pour osciller dans la cellule d'un pôle à l'autre et de ce fait, pourrait pousser les origines néo-répliquées en direction des pôles : ParA entraînerait ainsi dans son sillage la protéine ParB liée sur son site chromosomique (**Figure 18A**)(**Yamaishi 2004, Lim 2005, Ebersbach 2006, Ringgaard 2009, Ptacin 2010, Vecchiarelli 2010**).

→ Le système de type II : chez les eucaryotes les filaments d'actine servent par exemple : à l'adhésion des cellules entre elles ou à des surfaces, pour la forme des cellules, la ségrégation des plasmides, la synthèse des membranes. Chez les bactéries ces systèmes ne servent qu'à la ségrégation des plasmides. Trois composants forment ce type de système Par de type II : ParM une protéine dérivée de l'actine et ParR qui reconnaît spécifiquement la

séquence centromérique *parC*. Le système ParMRC a été l'un des premiers systèmes de ségrégation caractérisé (sur le plasmide R1) et les systèmes de ségrégation de type II sont d'ailleurs spécifiques aux plasmides (**Figure 18B**).

→ Le système de type III dérivé de la tubuline est le système de ségrégation le moins présent et le moins décrit chez les bactéries. On le retrouve chez certains *Bacillus* (*thuringensis* et *anthracis*) et il se distingue des deux autres systèmes de ségrégation car il ne dispose que d'une protéine similaire à la tubuline et d'une séquence centromérique (**Gerdes 2010**) (**Figure 18C**).

2.4.4-Organisation et ségrégation des chromosomes chez d'autres bactéries

Ci dessous, je vais décrire l'organisation et la ségrégation du/des chromosome(s) présent(s) chez des espèces autre qu'*E. coli*. Contrairement aux eucaryotes, les systèmes *par* chez les bactéries ne ségrégent pas le chromosome mais, servirait uniquement à localiser et organiser les régions Origine à certaines positions dans la cellule (**Wang 2013**).

Bacillus subtilis dispose d'un cycle cellulaire particulier (**Figure 19A**). Selon le stress environnemental, elle dispose de deux phases de croissance. Une phase végétative qui dispose d'un système Par pour organiser les régions Origine néo-répliquées et une phase de sporulation.

En phase végétative, la réplication est initiée au centre de la cellule et les régions néo-répliquées sont rapidement ségréguées en surface du nucléoïde (**Berlatzky 2008**). L'organisation du nucléoïde est de type *ori*→*ter* en début de cycle cellulaire et *ori*→*ter*/*ter*→*ori* une fois la ségrégation terminée (**Teleman 1998, Webb 1997, Wang 2013**) (**Figure 19A**). *B. subtilis* possède un système de ségrégation de type I où ParA se nomme Soj et ParB, Spo0J. Dix sites *parS* ont été identifiés chez cette bactérie et 8 sont localisés dans la région Origine. Dans un contexte où Soj n'est pas présente, aucun phénotype significatif n'est observé, uniquement 0,02% de cellules anucléées. En absence de Spo0J, le phénotype sur la ségrégation est plus notable avec 2% de cellules anucléées (**Ireton 1994**). Le rôle du système Par chromosomique chez *B. subtilis* dans la ségrégation de l'ADN reste peu significatif. Spo0J organise la région Origine en un unique *focus* en microscopie à fluorescence (**Lewis and Errington 1997**). La présence de Spo0J serait essentielle pour la condensation de la région Origine par l'accumulation de protéine SMC (**Breier and Grossman 2007, Sullivan 2009**).

Quand *B. subtilis* entre en phase de sporulation, 25% de l'ADN est directement imbriqué dans la pré-spore. Une translocase à ADN, SpoIIIE, pompe dans la pré-spore les 75% du chromosome restant en enlevant toutes les protéines sur l'ADN (**Marquis 2008**). RacA est une protéine qui est exprimée uniquement en phase sporulative et est nécessaire pour maintenir l'origine dans le pôle de la pré-spore via une interaction avec DivIVA, une protéine qui se lie uniquement au niveau des pôles (**Ben-Yehuda 2003, Wu and Errington 2003, Ben-Yehuda 2005**).

Caulobacter crescentus possède un chromosome unique circulaire et un système de ségrégation actif qui est l'un des seuls décrits à ce jour comme étant essentiel pour la survie de la cellule (**Toro 2010**). Il existe deux types de cellules chez cette bactérie.

Un cycle complet donne une cellule avec une ancre membranaire (cellule mère, Stalker) et une sans ancre (cellule fille, Swarmer) (**Figure 19B**). La réplication ne peut être initiée que dans le type cellulaire où l'ancre est présente. Il y a toujours un seul chromosome dans les cellules sans ancre membranaire. Le chromosome est organisé selon l'axe longitudinal de la cellule avec une localisation *ori*→*ter* de l'origine à l'ancien pôle et la région Terminale au nouveau pôle. La position d'un *locus* sur le chromosome correspond à sa position dans la cellule selon l'axe longitudinal (carte génétique) et l'orientation *ori*→*ter* (**Viollier 2004**). La réplication est initiée au niveau de l'origine à l'ancien pôle et se propage le long des deux bras Left et Right du chromosome, jusqu'à la région Terminale, de manière à avoir une organisation *ori*→*ter/ter*→*ori* (**Breier 2004**). Cette migration de l'origine est assurée par un système Par de type I (ParABS) ; ParB interagit avec la protéine PopZ qui aide au maintien de l'origine néorépliquée à l'ancien pôle tandis que ParA ségrège l'origine répliquée de l'ancien au nouveau pôle. Arrivée au nouveau pôle et suite à la formation du septum, la région Origine est attachée au pôle via TipN. La région Terminale migre alors du nouveau pôle au centre de la cellule (**Ebersbach 2008, Bowman 2008, Ptacin 2010**).

Vibrio cholerae dispose de deux chromosomes (ChrI et ChrII) qui possèdent chacun leur propre système de ségrégation Par. Celui du ChrI est homologue aux systèmes Par chromosomiques et celui du ChrII à ceux des plasmides (**Gerdes 2000**). La région Origine du chromosome I est localisée au niveau de l'ancien pôle tandis que celle du chromosome II est centrale (**Fiebig 2006**) (**Figure 19C**). Le système Par du ChrI n'est pas requis pour la ségrégation mais pour la localisation de la région Origine au pôle via la protéine trans-membraire HubP (**Yamaichi 2012**). La réplication chez ces deux réplicons ne s'effectue pas en même temps au cours du cycle cellulaire et la régulation de l'initiation de la réplication diffère d'un réplicon à l'autre.

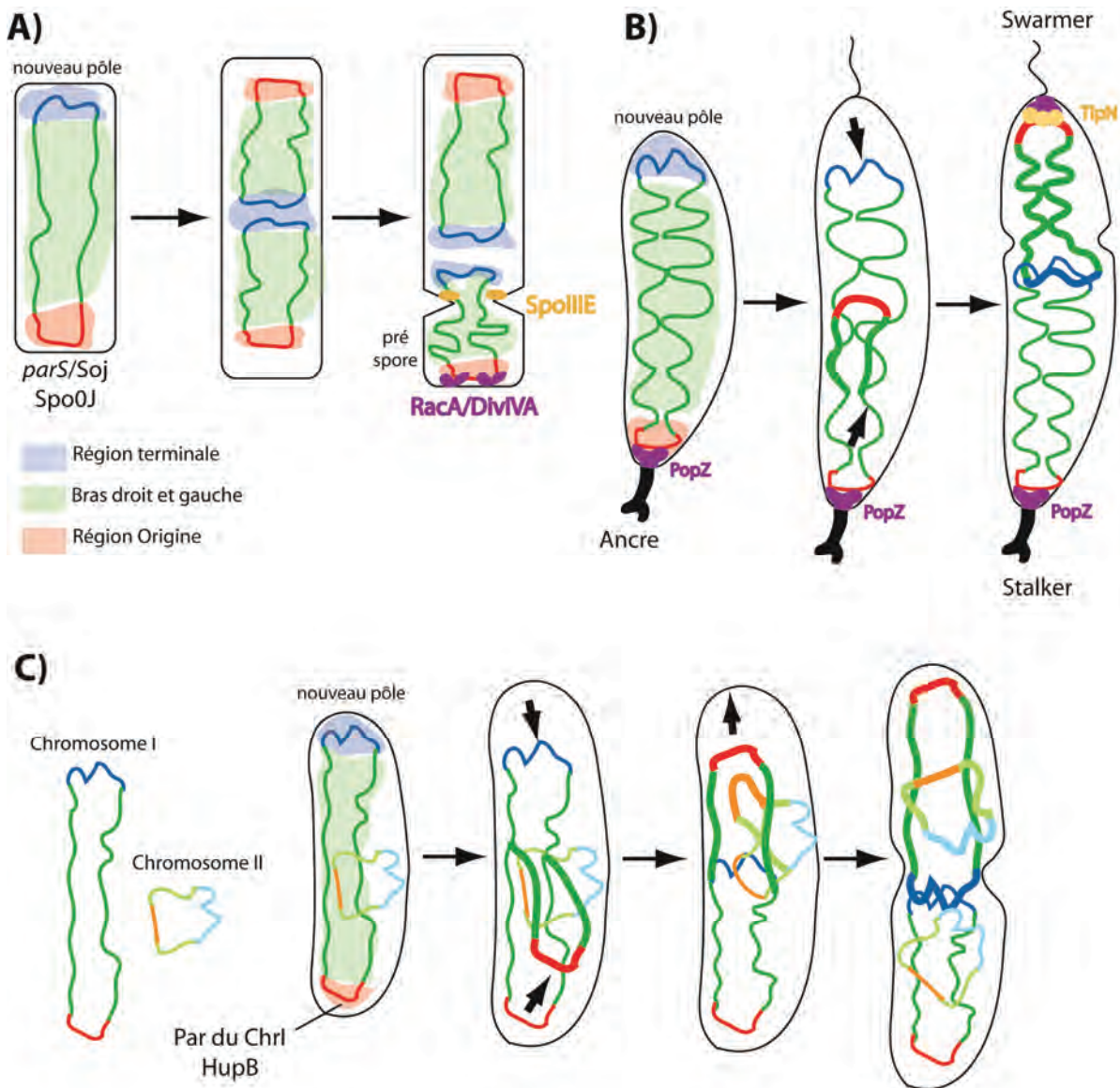


Figure 19 - Ségrégation chez différentes bactéries

(A) Ségrégation du chromosome chez *B. subtilis* en phase végétative avec l'organisation de la région Origine par la présence du complexe Par *parS/Soj/Spo0J*, et translocation de l'ADN dans la pré-spore avec l'attachement à la membrane de la région Origine via RacA et DivIVA. (B) Ségrégation chez *C. crescentus* initiée dans la cellule stalker. La région origine néorépliquée est localisée au nouveau pôle par l'interaction entre TipN et PopZ. (C) Ségrégation chez *V. cholerae* avec les chromosomes I et II qui disposent de systèmes Par différents : chromosomique pour le système Par du ChrI et plasmidique pour le système Par du ChrII.

Adapté de Toro 2010, Stokke 2011 et Wang 2013

Pseudomonas aeruginosa dispose d'un chromosome unique circulaire et d'un système de ségrégation de type I non essentiel. L'organisation du chromosome dans la cellule est longitudinale comme chez *Caulobacter crescentus* ; avec l'origine à l'ancien pôle et la région Terminale au nouveau pôle (Vallet-Gely and Boccard 2013). La réplication s'effectue au centre de la cellule. La région Origine migre au centre de la cellule en début d'initiation puis du centre aux pôles en fin de réplication (Vallet-Gely and Boccard 2013). Ici la réplication semble guider la ségrégation des *loci* du chromosome selon le modèle de Lemon et Grossman 2000.

2.5-Discussion sur la ségrégation des chromosomes

Au cours de la ségrégation des chromosomes plusieurs activités sont requises. (i) Les réplisomes disposent d'une dynamique particulière, soit fixe comme le modèle de Lemon et Grossman soit dynamique dans la région centrale (Reyes-Lamothe 2008) (ii) Les origines sont positionnées spécifiquement après la période post-réplivative, soit au niveau des pôles via une interaction physique avec des protéines attachées à la membrane, soit aux positions $1/4$ / $3/4$ chez *E. coli* mais dont le mécanisme de localisation est inconnu encore à ce jour. (iii) Tous les *loci* disposent d'une période de cohésion post-réplivative qui dépend de l'activité de la Topoisomérase IV et qui s'étend dans certaines régions. Cette cohésion étendue dépendrait de la présence d'attaches qui restent à caractériser.

Avec l'utilisation d'outils plus précis et d'algorithmes mathématiques puissants pour traiter les images issue de microscopie à fluorescence ainsi que d'outils physiques pour comprendre la dynamique du nucléoïde au cours du cycle cellulaire, on peut se rapprocher de plus en plus d'un modèle de dynamique du nucléoïde similaire chez les différentes espèces bactériennes relativement éloignées évolutivement. Par exemple, à l'opposé du modèle « Tether Loci Segregation », le modèle « Bulk Chromosome Segregation » repose sur l'entropie propre à l'ADN (Figure 7D,E). Théoriquement, si on prend deux polymères structurés (qui vont être assimilés à deux chromosomes répliqués avec leurs domaines topologiques) : lorsqu'ils sont mis ensemble dans un espace confiné, ils vont être capables selon certains paramètres décrits Partie I, de ségréger sans aucune force supplémentaire, juste en se servant de l'entropie contenu dans chaque domaine topologique sur chaque polymère. Ces domaines sont assimilés *in vivo* aux domaines topologiques qui sont présents sur tout le chromosome (Wang 2013, Jun 2006, Jun 2010).

E. coli et *B. subtilis* sont séparés par plus de deux milliard d'années d'évolution, soit deux fois plus que la distance évolutive entre l'homme et la levure, et pourtant de nombreuses caractéristiques dans la dynamique des cellules au cours du cycle cellulaire sont conservées, comme la nature de certains acteurs réplicatifs, cohésifs et divisionnels. Si d'une bactérie à l'autre l'orientation longitudinale du chromosome diffère, c'est certainement dû au système de ségrégation présent. En effet, il semble que chez les bactéries avec un système Par, l'orientation du (des) chromosome(s) dans la cellule suive un axe *Ori*→*Left/Right*→*Ter* alors que pour les bactéries n'ayant pas de système Par, l'axe est *Left*→*Ori/Ter*→*Right*. *B. subtilis* confirme ce classement puisqu'en phase végétative l'orientation est *Ori*→*Left/Right*→*Ter* avec un système Par présent comme chez *C. crescentus* alors qu'en phase de sporulation avec une translocation de l'ADN indépendante du système Par : SpoIIIE, l'organisation serait *Left*→*Ori/Ter*→*Right* comme chez *E. coli*. Il reste maintenant à comprendre le mécanisme précis des forces de ségrégation ; de découvrir les molécules responsables du relâchement cohésif suivant les deux modèles décrits plus haut ; soit un acteur commun et général si on suit le modèle de « Bulk Chromosome Segregation », soit différents acteurs spécifiques à certaines régions du chromosome pour les « tether » (attaches).

Dans cette deuxième partie, je me suis centré sur la ségrégation et la dynamique de toutes les régions du chromosome, mais sans préciser en détails celles de la région Terminale qui est plus complexe et différente du reste des régions. La partie III décrit les acteurs responsables de la dynamique de la région terminale, leurs interactions et propriétés.

3- Architecture et dynamique de la région Ter

3.1-Introduction historique

Par une introduction historique, je relate les principales découvertes qui ont menées à la caractérisation de la région Terminale en détaillant les dernières étapes de ségrégation de la région Terminale du chromosome et des acteurs y participant.

3.1.1-Qu'y a-t-il à la « fin » ?

Les découvertes d'une origine de réplication et d'un mécanisme bi-directionnel ont mené à s'interroger sur la terminaison de la réplication (**Bird 1972, Masters 1971, Prescott 1972**). En 1977, il a été supposé l'existence d'une zone où se termine la réplication : en déplaçant l'origine de réplication de plus d'un Mb de sa position d'origine, il a été observé que la réplication se terminait toujours dans la même région : la région Terminale du chromosome (**Louarn 1977**). La région où se termine la réplication se situe entre 31 min et 37 min sur le chromosome (**Figure 20A**) (**Kuempel et al 1977, Kuempel et al 1978**). Cependant il a fallu attendre presque dix ans pour pouvoir enfin passer d'une large région à de simples séquences responsables de l'arrêt des fourches de réplication (**Pelletier 1988, De Massy 1987, Hill 1987, François 1989**). Deux sites nommés T1 (28.5 min) et T2 (34.5-35.7 min) ont été caractérisés (**Figure 20A**). Après la publication du génome séquencé d'*E. coli*, le nombre de terminateurs de la réplication appelé alors « Ter » est passé de 2 à 10 (**Blattner 1997**). Une délétion de la région autour de TerB a montré que les fourches de réplication ne sont plus arrêtées à TerA suggérant la présence d'un gène dans la région à proximité de TerB qui coderait pour un acteur qui bloquerait les fourches de réplication. La protéine responsable de cet arrêt, nommée Tus, a été caractérisée par sa liaison sur le site TerR du plasmide R6K (**Sista 1989**). Tus se fixe sur tous les sites Ter et bloque les fourches de réplication en interagissant avec l'hélicase DnaB en amont des fourches de réplication (**Hiasa 1992**). Les sites Ter ont deux faces, une face permissive (**Figure 20B**) pour laisser passer les fourches dans le sens *ori*→*ter* et une face non permissive (**Figure 20C**) pour arrêter les fourches de réplication quand elles remontent après avoir dépassées le changement de biais GC (et donc de réplicore) dans la région Terminale.

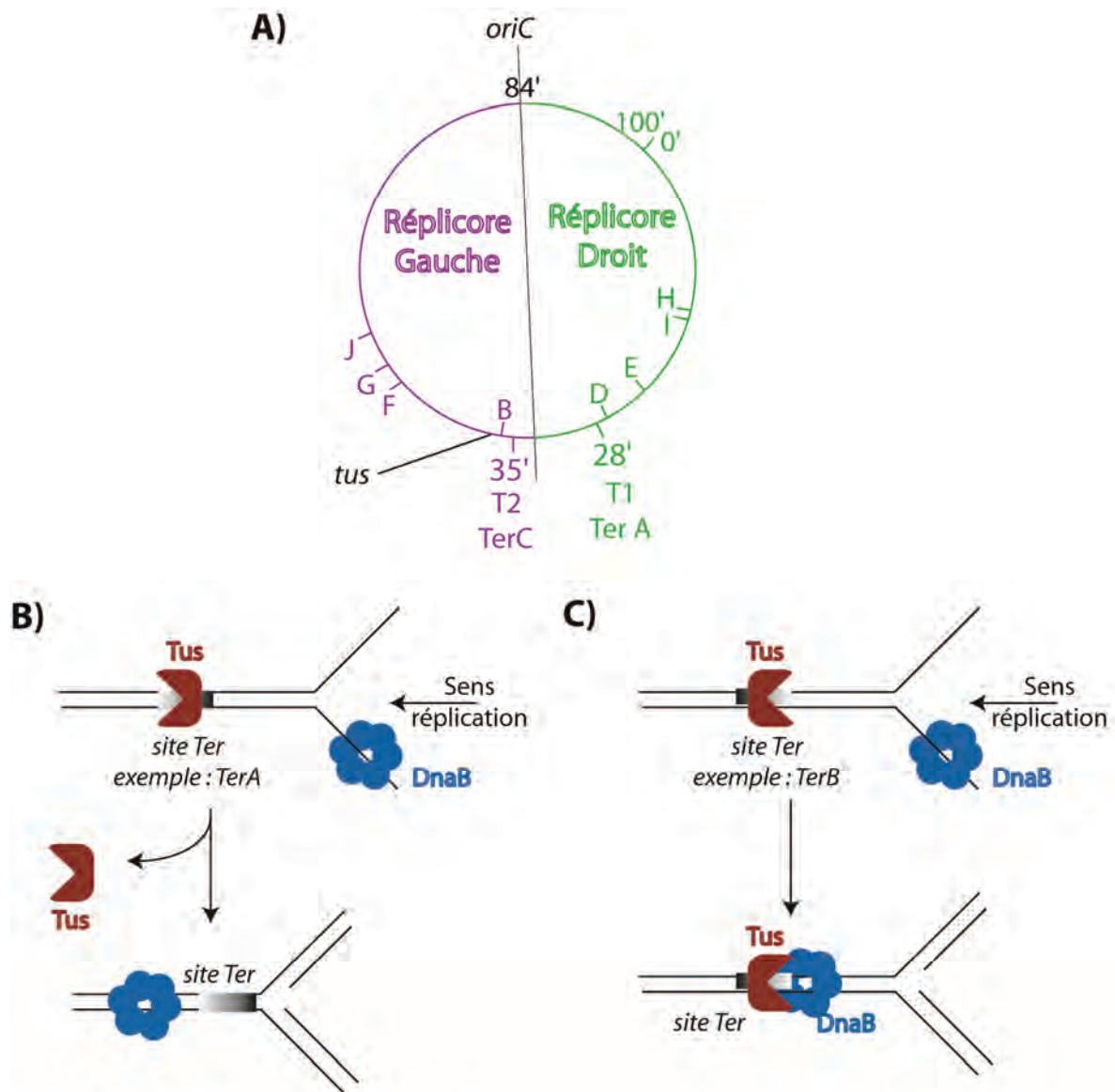


Figure 20 - Terminaison de la réplication

(A) Carte génétique des sites de terminaison de la réplication. Les lettres représentent les sites Ter qui bloquent les fourches de réplication. Le changement de couleur (vert / violet) représente le changement de biais GC. (B) Orientation permissive d'un site Ter qui laisse passer DnaB et ne bloque pas les fourches de réplication. DnaB est devant les fourches de réplication qui ne sont pas représentées sur ce modèle. (C) Orientation non permissive d'un site Ter qui bloque le passage de DnaB marquant une pause dans la réplication de l'ADN. Cette pause ralentit la réplication mais non définitivement.

3.1.2-Découverte du site *dif*

Le site *dif* a été décrit en premier pour un rôle dans la ségrégation du chromosome et la recombinaison dépendante de XerC (**Blakely 1991, Clerget 1991 et Kuempel 1991**). Ces travaux montrent que XerC (chromosomally encoded recombinase) est une recombinase spécifique de site qui résout les formes multimérique du plasmide ColE1 en monomères (**Clerget 1991, Blakely 1991**). XerC a été décrite comme importante dans la ségrégation du chromosome et permettant de contrôler la division cellulaire. La fonction de ce site est de permettre la résolution des dimères de chromosomes (**Kuempel, 1991**). Le site *dif* a été nommé suite au phénotype de filamentation induit par sa délétion. Ce phénotype de filamentation observé est lié à l'incapacité de la cellule à résoudre les structures dimériques (**Kuempel, 1991**). Les formes dimériques ont été caractérisées sur des ADN phagiques dès le début des années 1980 et montrent que leur formation est RecA dépendante (**Chattorag 1980**). Le site *dif* chromosomique, à la différence des sites *cer* et *psi*, ne possède pas de séquences accessoires faisant intervenir d'autres protéines en *cis* (comme ArgR et PepA) pour permettre la réaction de recombinaison. Le site *dif* se compose d'une séquence palindromique de 28 pb avec une séquence cœur de 6 à 8 pb (**Figure 13B**).

3.1.3-Polarisation et propriétés de la région Terminale

La découverte des deux premiers sites de terminaison de la réplication (T1 et T2) a fait germer l'idée d'une polarisation du chromosome de part et d'autre du site d'initiation de la réplication *oriC* (**De Massy 1987**). En inversant certaines régions du chromosome, ayant une des deux extrémités dans la région Terminale, il a été observé que la viabilité des souches est fortement diminuée (**Rebollo 1988**). Deux zones dites non divisibles (NDZ) ont alors été caractérisées (**Figure 21**). Elles correspondent toutes deux à des régions où des inversions effectuées avec une extrémité dans ces régions, sont défectueuses phénotypiquement pour la survie de la cellule. Ces premiers résultats montrent une polarisation et organisation particulière du chromosome dont l'origine de réplication est le point de départ et dont le point de convergence est dans la région Terminale. En mesurant la fréquence de recombinaison de rapporteurs pro-phagiques insérés à différentes positions du chromosome d'*E. coli*, il a été observé que la région où se termine la réplication du chromosome (T1-T2) est celle qui possède le plus haut taux de recombinaison. Dès lors il a été suggéré la présence d'une région

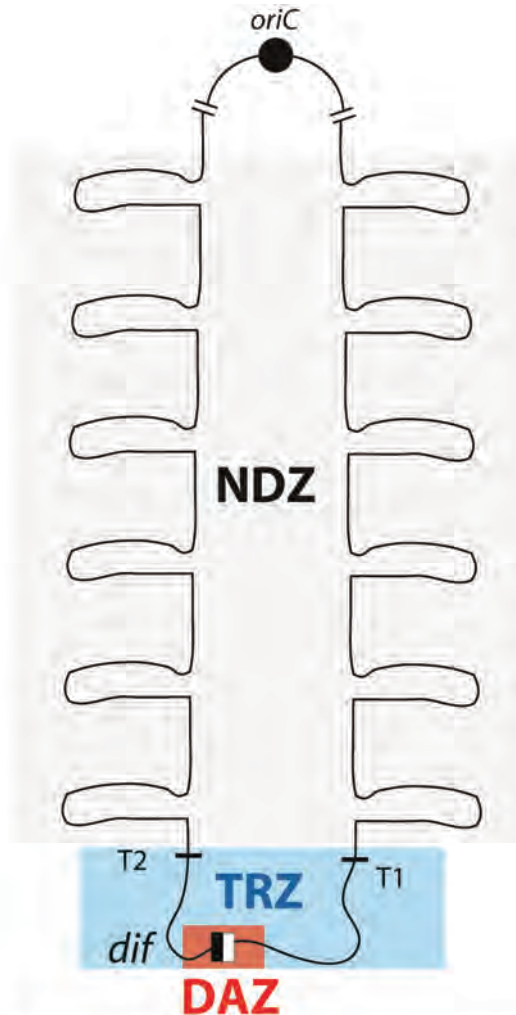


Figure 21 - NDZ, TRZ et DAZ

Sous organisation du nucléoïde en domaines où les inversions faites ne sont pas viables pour la survie de la cellule : Zones Non Divisibles (NDZ). La Zone Terminale de Recombinaison (TRZ) possède un taux de recombinaison *dif* dépendant élevé. La Zone d'Activité de *dif* (DAZ) de 20-30kb autour du site *dif* possède une polarité importante qui est responsable de l'activité à *dif*.

Adapté de Rebollo 1988, Louarn 1994 et Cornet 1996

précise dans la région Terminale qui serait à l'origine de ce haut pourcentage de recombinaison (**Louarn 1991**).

La région possédant un taux élevé de recombinaison fut par la suite nommée TRZ (terminal recombination zone) (**Figure 21**). La présence de différents facteurs peut être responsable de ce taux élevé de recombinaison. Ces pourcentages de recombinaison ne dépendent pas du site *dif* car une délétion de *xerC* et une suppression du site *dif* confèrent toujours à cette région un taux de recombinaison élevé. Dans une souche où la terminaison de la réplication a été altérée, la TRZ possède toujours une recombinaison élevée signifiant que la recombinaison ne dépend pas de la terminaison de la réplication (**Louarn 1994**). De plus, la suppression totale de la TRZ ne change pas le taux de recombinaison de la région Terminale. L'accumulation de liens d'intercaténation entre les deux chromosomes frères dans la région Terminale serait responsable du haut pourcentage de recombinaison dans cette région (**Louarn 1994**).

Dans une souche avec une grande inversion du chromosome où le site *dif* se retrouve à 78' sur la carte génétique (limite de la région Origine), le cycle réplcatif n'est pas altéré, même si les terminateurs de réplication s'en trouvent déplacés. Dans une telle souche, la réplication partant d'*oriC* se termine pourtant beaucoup plus tôt sur l'un des deux brins (**Cornet 1996**). En transformant cette souche inversée pour qu'elle soit *dif*⁻, on observe toujours une filamentation. Si cette souche est *tus*⁻, il n'y a pas de phénotype particulier. Ces résultats dans ces deux souches (*insérée dif*⁻ et *inversée tus*⁻) suggèrent que la période de réplication du site *dif* n'a pas d'influence sur la physiologie de la cellule. En supprimant la région d'un côté du site *dif* aucun phénotype *dif*⁻ est observé. Mais en supprimant les deux régions autour du site *dif*, une filamentation est observée. Ce qui suggère que c'est la nature même des séquences autour du site *dif* qui permet l'activité à *dif* (20-30kb autour du site *dif*). La notion de barrière de l'activité à *dif* fut donc mise en avant avec la DAZ (*dif* Activity Zone) (**Cornet 1996, Figure 21**). Ces barrières seraient des séquences aux motifs biaisés qui convergeraient vers *dif*. Un essai de recombinaison avec une cassette *dif-kn-dif* (dans une souche *dif*⁻) confirme la fenêtre de la DAZ avec une recombinaison élevée à *dif*, renforçant l'hypothèse d'un biais de motifs à *dif* (**Perals 2000, Capioux 2000**).

3.1.4-Recombinaison XerCD/*dif*

La similitude de séquence entre *dif* et le site *cer* du plasmide ColEI a permis de conclure que le site *dif* était un substrat pour XerC et que cette fixation permet de résoudre les

formes multimériques du chromosome en monomères (**Blakely 1991, Clerget 1991**). XerD a été caractérisée sous le nom de XprB en temps que partenaire transcriptionnel de RecJ, puis renommée XerD suite à l'alignement de séquence avec XerC, qui montrait la conservation d'un domaine commun aux recombinaisons à tyrosine et 37% d'identité générale (**Lovett and Kolodner 1991, Blakely 1993**). XerC et XerD fixent le site *dif*, chacune sur une moitié palindromique du site *dif* de part et d'autre de la séquence cœur de 6 pb (**Blakely 1993, Blakely 1994, Spiers and Sherratt 1999**) (**Figure 13B**).

L'activité de XerC/XerD à *dif* permet la résolution des dimères de chromosome (**Figure 13, Kuzminov 1995**). La formation des dimères est dépendante de RecA et la non résolution conduit systématiquement à la filamentation de 10 à 15% des cellules d'une culture en phase exponentielle de croissance. Les chromosomes frères sous forme dimérique ne peuvent être alors ségrégués correctement. Un effet dit de « Guillotine » conduit à la coupure du chromosome au septum et à l'induction du système SOS.

La résolution des dimères dépend de différents paramètres environnant le site *dif* : (i), la résolution des dimères de chromosome n'est efficace que si le site *dif* est situé dans la DAZ (**Leslie and Sherratt 1995, Tecklenburg 1995, Cornet 1996, Kuempel 1996**), (ii), cette résolution ne peut se faire qu'une fois le septum formé suggérant l'action d'une protéine du divisome ou d'un acteur tardif du cycle cellulaire dans la résolution de ces structures (**Blakely 1991, Kuempel 1991, Cornet 1996, Hendricks 2000, Steiner and Kuempel 1998**) et (iii), la capacité à résoudre les dimères de chromosome au site *dif* est fonction d'éléments interchangeables très proches du site *dif*, pouvant être des séquences oligomériques (**Cornet 1996, Kuempel 1996, Peralas 2000, Capioux 2000**).

Les sites *oriC* et *dif* sont les sites où la polarisation du chromosome d'*E.coli* selon un axe *oriC*→*dif* change (biais GC). La terminaison de la réplication pourrait s'effectuer autour du site *dif* si les fourches de réplication avancent à la même vitesse (**Higgins 2007**). La présence du complexe XerCD/*dif* est conservée chez de nombreuses bactéries comme chez *B.subtilis* avec les recombinaisons RipX et CodV, mais il ne peut y avoir qu'une seule recombinaison comme dans de nombreuses souches comme chez les Streptocoques (**Sciocchetti 2001, Nolivos 2012**).

Le site *dif* est très conservé chez les bactéries ; il peut être présent sur des plasmides sans qu'un gène codant pour une recombinaison site spécifique soit aussi présente. Par exemple, les alpha/beta/gamma protéobactéries et firmicutes possèdent un site *dif* dont la séquence consensus est conservée pour une même famille de bactéries (**Kono 2011**).

3.2-Longer, bigger, faster, stronger ; FtsK

FtsK est une protéine requise pour la formation du divisome (**Figure 22B**). FtsK est une translocase, ou pompe à ADN, dont la fonction a été caractérisée en premier pour l'activation de la recombinaison XerCD/dif et non pour la ségrégation de l'ADN. FtsK tient son nom de l'étude de protéines qui ont été caractérisées par des mutations entraînant un phénotype de filamentation à haute température (Filamenting temperature-sensitive mutant K) (**Hirota 1970, Begg 1995**) (**Figure 22A**). Ces protéines interviennent dans la formation du divisome et sont adressées au septum en toute fin du cycle cellulaire dans un ordre précis (**Figure 22B**). FtsZ est une protéine homologue aux tubulines. FtsZ se fixe en patch de proto-filaments de manière à ce que ces patchs interagissent les uns avec les autres pour former un anneau de FtsZ (**Erickson 1996, Nogales 2000, Adams and Errington 2009**).

FtsK est localisée au niveau du divisome comme les autres protéines Fts décrites auparavant (**Wang 1998**). FtsK a été caractérisée structurellement en montrant que seul son domaine N-Ter joue un rôle pour la formation du divisome (**Figure 23A**) (**Draper 1998**). Le rôle du domaine C-Ter de FtsK a été suggéré comme jouant un rôle dans la translocation car sa structure est homologue à celle du même domaine C-Ter de SpoIIIE, une translocase décrite auparavant chez *B.subtilis* (**Wu and Errington 1994, Wu 1995**). La délétion du domaine C-Ter de FtsK a montré que c'est cette région qui est responsable du rôle de FtsK dans le mécanisme de ségrégation des chromosomes bien que ce domaine ne soit pas essentiel à la survie de la cellule (**Yu 1998, Diez 1997**). Le rôle de FtsK dans la résolution des dimères de chromosome a été décrit lorsque, dans une souche où l'expression du domaine C-Terminal de FtsK (dans une souche *ftsKΔC*) est sous le contrôle d'un promoteur inductible en présence d'arabinose (le domaine N-ter étant exprimé constitutivement dans la cellule car essentiel), l'absence d'arabinose provoque la formation de 10 à 15% de cellules avec un phénotype de filamentation et la perte de recombinaison entre les sites *dif* (**Steiner 1998**). FtsK active donc la résolution des dimères de chromosome et c'est la présence de dimères non résolus qui provoquerait le défaut de ségrégation observé (**Recchia 1999, Boyle 2000**).

A)



B)

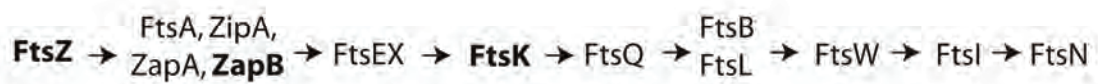


Figure 22 - Phénotype fts et acteurs de l'anneau Z

(A) Exemple du phénotype où un acteur du divisome (anneau Z) n'est plus exprimé. Dans de telles conditions, la synthèse septale de peptidoglycane est stoppée mais la synthèse longitudinale de peptidoglycane se poursuit. **(B)** Ordre de l'assemblage des protéines du divisome. Les acteurs interagissent entre eux de manière à rendre essentielle la présence de chaque acteur pour le maintien de la stabilité de l'anneau Z. Certains de ces acteurs comme ZapB et FtsK possèdent un rôle autre que celui de "stabilisateur" du divisome.

3.2.1-Bigger, longer : structure et interaction.

FtsK est la plus grosse protéine chez *E. coli* (1329 aa). Elle est composée de deux principaux domaines N-ter (183aa) et C-ter (490) reliés par un linker de 656aa (**Figure 23A**). La taille de ce linker varie considérablement pour les orthologues de FtsK chez d'autres bactéries comme *B.subtilis* où SpoIIIE possède un linker de 134aa, un domaine N-Ter de 181 aa et un domaine C-Ter de 471 aa (**Figure 23A**). FtsK et SpoIIIE sont deux transporteurs à ADN double brins et partagent 50% d'identité. Si le domaine N-Ter de FtsK est essentiel pour la formation du divisome, le domaine C-Ter n'est pas essentiel pour la survie de la bactérie et les phénotypes varient d'une espèce à l'autre. Le domaine C-Ter est fonctionnel en hexamère (**Bigot 2007**). Le domaine N-Ter est essentiel pour la stabilisation des autres protéines de l'anneau Z : la létalité d'un mutant FtsK est compensée par une surexpression des protéines FtsG, FtsN, FtsZ et FtsA (**Draper 1998, Geissler and Margolin 2005, Goehring 2006**).

FtsK intervient à la fin du cycle cellulaire chez *E. coli*, SpoIIIE lors de la sporulation chez *B.subtilis*, enfin, les protéines Tra (TraB) interviennent lors de la conjugaison chez les Streptomyces. Tra est une famille de transporteur, d'ADN ATP-dépendant qui possède les mêmes propriétés que SpoIIIE et FtsK et dont le gène est situé sur un plasmide conjugatif (**Vogelmann 2011**). Le domaine C-Ter de ces protéines est conservé chez de nombreuses autres espèces (**Figure 23B**).

Le domaine C-Ter se divise principalement en trois sous-domaines : alpha, beta et gamma (**Aussel 2002, Yates 2003**). Le domaine C-Ter porte l'activité de translocation de l'ADN et s'organise en hexamère pour transloquer l'ADN (**Aussel 2002**). Le domaine C-Ter lie et hydrolyse l'ATP via respectivement les sous-domaines alpha et beta (**Barre 2007**). Le sous-domaine gamma est requis pour la résolution des dimères de chromosome (**Cf partie 2.2.4**) et active la recombinaison XerCD/*dif* (**Grainge 2011**). Ce sous-domaine modifie la conformation du complexe XerCD/*dif* pour permettre le premier échange de brin via un contact direct avec XerD, puis XerC résoud ensuite la jonction de Holliday ainsi formée (**Barre 2000, Aussel 2002**) (**Figure 13C**).

La topologie au site *dif* en fin de cycle cellulaire est particulière : il a été montré que la Topoisomérase IV est très active au niveau de ce site et que son activité nécessite la présence des recombinases XerC et XerD (**Hojgaard 1999**). *In vitro*, une interaction physique entre la Topo IV (sous unité ParC) et le domaine C-Ter de FtsK a été montrée et l'activité de FtsK modulerait celle de la Topo IV (**Espeli 2003, Bigot 2010**). Cependant le rôle de l'interaction entre FtsK et la TopoIV n'est pas encore compris à ce jour. Aussi, il a été montré que l'activité de translocation de FtsK : modifie la topologie environnante du site *dif*, simplifie la

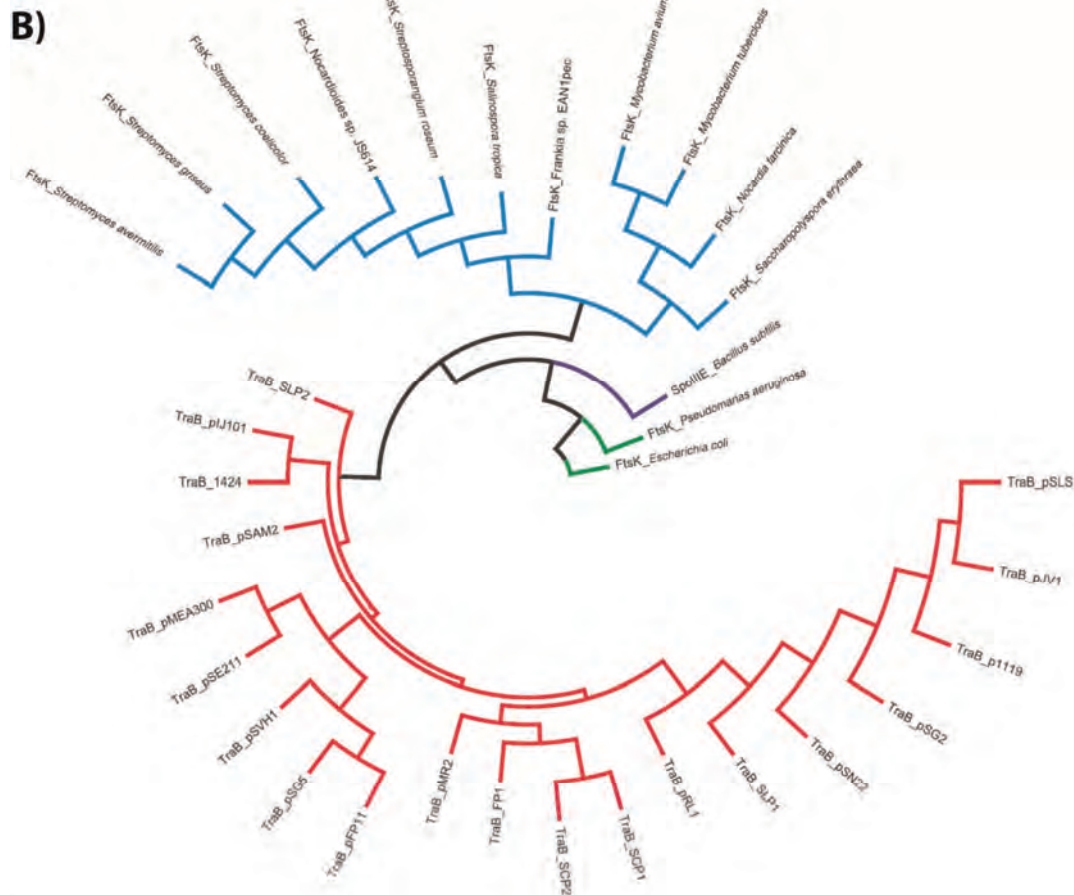
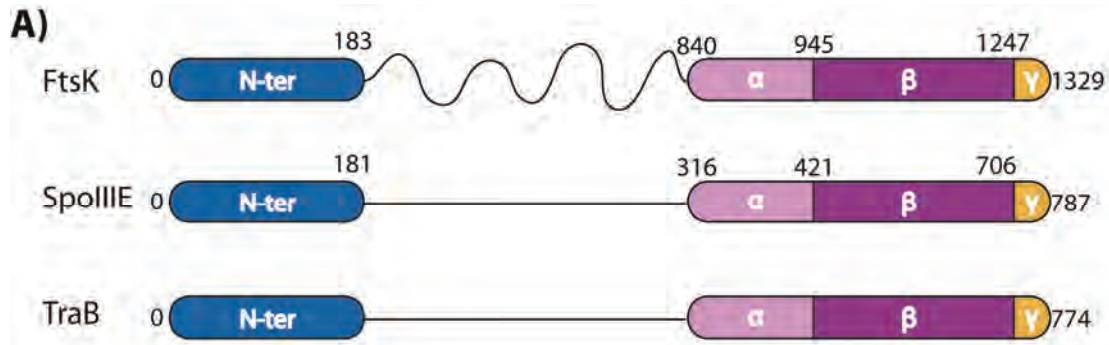


Figure 23 - Structure et conservation des translocases à ADN

(A) Domaines des protéines FtsK, SpoIIIE et TraB représentés en fonction de leur taille. Seule la taille du linker de FtsK diffère des protéines SpoIIIE et TraB. (B) Arbre phylogénique de la conservation du domaine C-Ter des translocases FtsK et Tra. FtsK est conservée pour l'activation de la recombinaison XerCD/dif chez certaines bactéries tandis que Tra est conservée chez certains plasmides conjuguatifs.

Inspiré de Barre 2007 et Vogelmann 2011

topologie des produits de recombinaison, et facilite la formation de la synapse XerCD/*dif* (**Ip 2003, Saleh 2004**). Chez *C.crescentus*, la formation des *foci* de ParC dépend de l'activité de translocation de FtsK (**Wang 2005**).

3.2.2-Faster, stronger ; polarité, translocation et dynamique

3.2.2.1-Reconnaissance de séquences biaisées

La présence d'une polarisation du chromosome qui change au site *dif*, le fait que la résolution des dimères de chromosome soit activée par FtsK au site *dif* et la présence de séquences oligomériques biaisées au site *dif* autres que les séquences Chi (Cross-over Hot-spot Instigator, séquences reconnues pour la recombinaison homologue RecBCD), ont permis d'émettre l'hypothèse que FtsK transloque l'ADN via la reconnaissance de ces séquences polarisées (**Perals 2000, Capioux 2001, Lesterlin 2004 Pour revue**). La délétion successive de séquences autour du site *dif* a permis de mettre en évidence des motifs dégénérés biaisés nommés KOPS (FtsK Oriented Polarized Sequence) reconnus par FtsK (**Bigot 2005**). Ces motifs de 8 pb (GGGNAGGG) sont orientés sur tout le chromosome suivant le changement de biais GC au site *dif* et leur concentration est plus importante dans la région Terminale (**Figure 24A**). Chez *B. subtilis* des séquences similaires appelées SRS ont été découvertes et jouent le même rôle que les KOPS pour SpoIIIE (**Hendrickson 2006**). Les motifs KOPS sont aussi présents chez les Streptomyces (**Vogelmann 2011**). Un KOPS est présent en moyenne tous les 12 kb sur le chromosome d'*E. coli* et permet d'orienter FtsK en direction de la région Terminale (**Levy 2005**). Les KOPS sont reconnus physiquement par le sous-domaine gamma de FtsK (**Ptacin 2006, Sivanathan 2006**). FtsK est peu processive, avec des translocations rapides sur de courtes distances nucléotidiques (9kb) (**Saleh 2004**). La présence de KOPS sur tout le chromosome d'*ori* à *ter* permet à FtsK de se charger régulièrement sur le chromosome. Trois résidus mutés du sous domaine gamma conduisent à ne plus reconnaître les KOPS (**Sivanathan 2006, Sivanathan 2009**). Trois sous-domaines gamma sont suffisants pour reconnaître une séquence KOPS et activer la recombinaison XerCD/*dif* (**Löwe 2008**) (**Figure 24B**).

Deux modèles possibles existent quant à la reconnaissance des KOPS et l'activation de la translocation de FtsK. Le premier modèle, suggère que FtsK se charge préférentiellement au niveau d'un KOPS, que la translocation de FtsK est orientée après ce chargement, et que, quand FtsK transloque l'ADN, elle ne reconait plus les KOPS (**Bigot 2006, Löwe 2008, Graham 2010**). Dans ce modèle, FtsK reconnait les KOPS dans l'orientation *ori*→*dif*

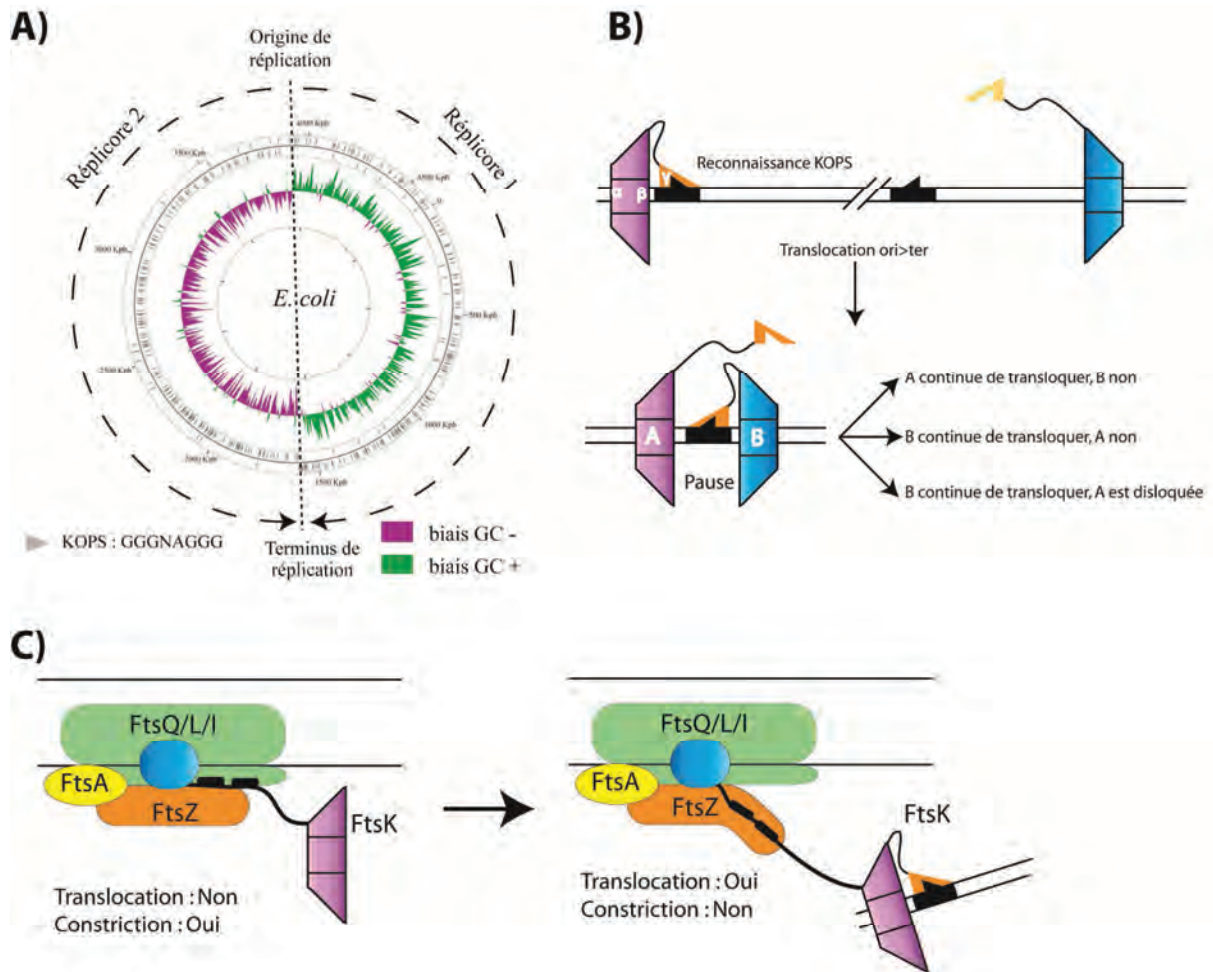


Figure 24 - Translocation de FtsK

(A) Polarisation des KOPS sur le chromosome. Le biais GC est présent en vert et violet selon l'axe *oriC/dif*. La concentration des KOPS augmente dans la région Terminale. **(B)** Principe de l'orientation de FtsK sur l'ADN en présence de KOPS. FtsK sous forme hexamérique (ici représentée avec 3 domaines C-Ter et un sous domaine gamma) reconnaît les séquences KOPS via son domaine gamma et transloque l'ADN selon l'orientation *oriC*->*dif*. Quand un hexamère en rencontre un autre, l'un poursuit sa translocation tandis que l'autre est disloqué. **(C)** Possible rôle du linker de FtsK en fonction de l'activité de translocation de FtsK qui activerait / réprimerait la synthèse septale de peptidoglycane. La translocation de FtsK et l'augmentation de la tension sur le linker arrêterait la synthèse axiale de peptidoglycane.

Inspiré de Nolivos 2010, Lowe 2008 et Dubarry 2010

(permissif) mais quand les KOPS sont non permissifs ou lors de la rencontre d'un autre hexamère en sens opposé, FtsK marquerait une pause et / ou se dissocierait (**Figure 24B**). Le deuxième modèle se base sur les travaux effectués chez *B. subtilis* avec SpoIIIE (**Fiche 2013, Cattoni 2013**). SpoIIIE reconnaîtrait n'importe quel ADN et rechercherait ensuite la présence d'un SRS. Une fois le SRS reconnu, la translocation de SpoIIIE est activée.

3.2.2.2-Mécanisme de translocation

In vitro, FtsK transloque l'ADN à une vitesse de 5-7kb par seconde, c'est la pompe à ADN la plus rapide qui ait été caractérisée jusqu'à présent (**Saleh 2004, Massey 2006**). L'hydrolyse de l'ATP et le relâchement de l'ADP par le sous-domaine beta entraîneraient un changement de conformation qui éloigne le sous-domaine beta du sous-domaine alpha et mène à la translocation de l'ADN de moins de deux pb (**Graham 2010**). Les domaines C-ter organisés en hexamère permettent d'alterner l'hydrolyse de l'ATP un monomère sur deux : trois monomères actifs sur six sont suffisants pour générer une activité de translocation (**Löwe 2008, Crozat 2010**). FtsK tourne autour de l'ADN une fois tous les 150 pb (**Saleh 2005**). Lorsque FtsK transloque l'ADN, elle est capable d'enlever toutes les protéines présentes sur l'ADN pendant sa translocation, comme SpoIIIE chez *B.subtilis*, sauf au niveau du site *dif* où sa translocation est stoppée par la présence de XerC et XerD et où elle active la recombinaison en présence de dimères de chromosome (**Graham 2010**).

3.2.2.3-Dynamique de FtsK

FtsK est active en toute fin du cycle cellulaire une fois la formation du divisome initiée. L'activation du système XerCD/*dif* intervient en toute fin du cycle et ce système est localisé au centre de la cellule juste avant que le septum de division se forme (**Steiner and Kuempel 1998, Kennedy 2008**). Le linker de FtsK contrôle la division cellulaire et interagit avec certains domaines des protéines tardives de la formation du divisome comme FtsW, FtsQ et FtsL. L'élongation/non élongation du linker via la translocation/non translocation de l'ADN alternerait la constriction du septum et la translocation de l'ADN (**Dubarry 2010, Figure 24C**). A la fin de la division, c'est à dire une fois la séparation des cellules filles nette, FtsK (comme SpoIIIE) disparaît des nouveaux pôles (**Wang and Lutkenhaus 1998, Yu Tran Sun 1998, Wu and Errington 1997**).

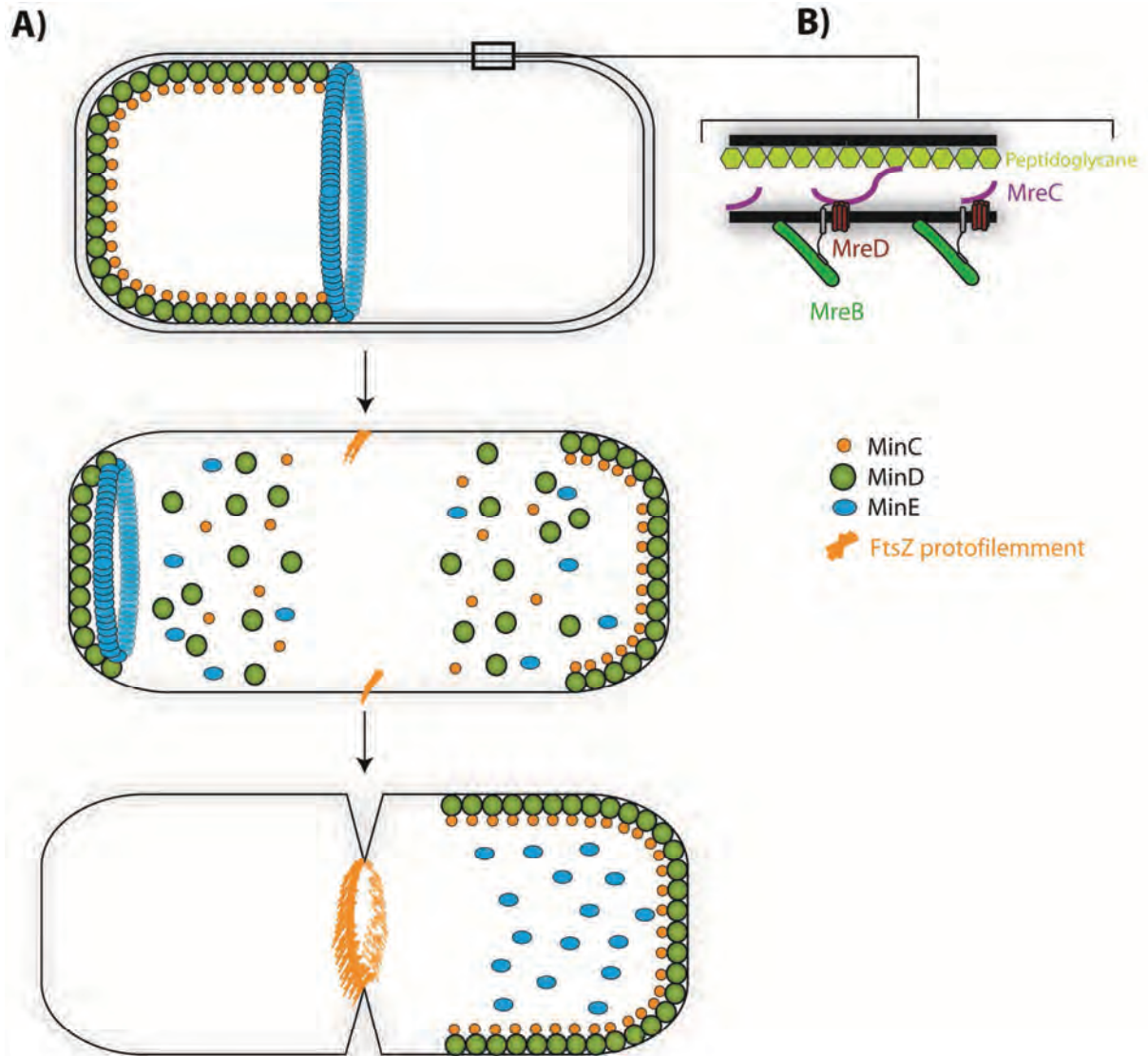


Figure 25 - MreB et Min

(A) Principe de l'inhibition de la formation de l'anneau Z aux pôles par l'oscillation des protéines MinCDE. La dynamique de ces protéines permet une inhibition locale de la formation des protofilaments de FtsZ par MinC. MinD et MinE servent à la localisation du complexe **(B)** Localisation et organisation de MreB représentée volontairement en patch.

Adapté de White and Gober 2012 et Thanbichler 2010

SpoIIIE transloque l'ADN en phase sporulative et végétative chez *B.subtilis* (**Fiche 2013**). En phase végétative, SpoIIIE peut être localisé dans la membrane sous forme active ou monomérique (**Fiche 2013**). La relocalisation de SpoIIIE lors de la formation de la pré-spore provient de l'interaction entre SpoIIIE et des acteurs du divisome. SpoIIIE est ensuite localisée au niveau des extrémités de septum comme FtsK et transloque alors efficacement le chromosome en reconnaissant les SRS. Chez *V.cholerae*, FtsK_{vc} active la recombinaison via les recombinases XerC_{vc} et XerD_{vc} aux deux sites *dif1* et *dif2* des chromosomes I et II. FtsK_{vc} est orientée via des séquences spécifiques comme les KOPS (**Val 2008**). Chez *C.crescentus*, FtsK_{cc} joue aussi un rôle majeur dans les dernières étapes du cycle cellulaire, pour la ségrégation et la septation (**Wang 2005**). A la différence de FtsK et SpoIIIE, chez *C.crescentus*, la localisation de FtsK_{cc} à la fin du cycle cellulaire reste polaire. Chez *Lactococcus lactis*, FtsK_{LI} active la recombinaison au site *dif* de *Lactococcus lactis* via une unique recombinase XerS (**Le Bourgeois 2007**). Le sous-domaine gamma de la protéine FtsK_{LI}, reconnaît un motif qui diffère en taille et séquence des KOPS chez *E. coli* et SRS chez *B. subtilis* (**Nolivos 2010, Nolivos 2012**).

3.3-Septation et régulation de la formation du septum

L'allongement des cellules et la formation du septum nécessitent la synthèse de peptidoglycane. Il existe deux types de synthèse de peptidoglycane, une longitudinale médiée par MreB pour l'élongation de la cellule et l'autre axiale médiée par FtsZ pour la constriction du septum (**Figure 24C**). Les composants qui interviennent dans la formation du septum et sa constriction sont les protéines Fts. Ces protéines sont réparties en deux classes : celles qui sont associées précocement à l'anneau Z et celles qui le sont tardivement. Les protéines précoces du divisome localisent au centre de la cellule sans que le septum soit déjà formé (**Wang and Lutkenhaus 1998**).

MreB (Murine Région E) est une protéine similaire à l'actine qui joue un rôle dans le maintien de la forme cylindrique des cellules chez *E. coli* en intervenant dans la synthèse du peptidoglycane. MreB est présente dans la plupart des bactéries disposant d'une forme cylindrique et absente dans la plupart des coques à quelques exceptions près (**Alyahya, 2009**). Cette protéine a longtemps été décrite à travers des dizaines de publications comme étant organisée sous forme d'hélice. Très récemment, MreB a été montrée comme localisée en patch et se déplaçant dans la largeur de la cellule (**Garner 2011**) (**Figure 25B**). Le rôle de

MreB dans la ségrégation de l'ADN est assez controversé chez *E.coli*, *B.subtilis* et *C.crescentus* (**Formstones and Errington 2005, Chastanet and Carballido lopez 2012**).

La formation de l'anneau Z est contrôlée temporellement et spatialement par deux systèmes : le système d'Occlusion du Nucléoïde (ON) et le système Min. Le système d'ON est régi par une unique protéine, SlmA, tandis que le système Min l'est par trois protéines MinC, MinD et MinE. MinCDE est codé par l'opéron *minB* (**de Boer 1989**) (**Figure 25A**). La particularité de ce système est l'oscillation observée d'un pôle à l'autre de la cellule menée par MinC via l'hydrolyse de l'ATP et son interaction avec des phospholipides membranaire (**Hu and Lutkenhaus 2001, Shih 2003**). Ce mécanisme d'oscillation est responsable d'une plus grande concentration des protéines Min aux pôles qu'au centre de la cellule. MinC est un antagoniste de FtsZ ; le système Min pousse donc la formation de l'anneau Z à ne se faire qu'au centre de la cellule (**Hale 2001**) (**Figure 25A**).

Le premier facteur d'ON, Noc, a été identifié chez *B.subtilis* (**Wu and Errington 2004**). Chez *C. crescentus*, le facteur d'ON est MipZ (**Thanbichler and Shapiro 2006**). Chez *E. coli*, SlmA a été identifiée comme étant ce facteur (**Bernhardt and de Boer 2005**). SlmA, Noc et MipZ ne sont pas homologues en séquence et appartiennent à trois familles différentes de protéines bien qu'ils bloquent tous les trois la formation du septum au centre de la cellule. Un simple mutant *minCDE* ou *slmA* ne possède pas un phénotype très différent de la souche sauvage, mais un double mutant (synthétique léthal) conduit à la filamentation de la majorité des cellules en empêchant la formation de l'anneau Z, laissant supposer que l'absence d'un système est compensée par la présence de l'autre (**Bernhardt and de Boer 2005**). SlmA est associée au nucléoïde, ce qui signifie que la dynamique du nucléoïde est responsable de l'inhibition de la formation de l'anneau Z par SlmA. SlmA inhibe la formation des proto-filaments de FtsZ (**Bernhardt and de Boer 2005, Cho 2011, Cho 2013**) (**Figure 26A**). SlmA se lie au nucléoïde par la reconnaissance de séquences spécifiques (SBS : SlmA Binding Site) de 12 pb présentes dans presque toutes les régions du nucléoïde (**Tonthat 2011, Cho 2011**) (**Figure 26B**). SlmA forme des dimères et n'est active que lorsqu'elle se fixe sur ces sites (**Figure 26A**) (**Cho 2011**). SlmA se lie sur tout le chromosome sauf les régions Right et Ter (**Tonthat 2011, Cho 2011**). Lorsque les régions Origine et Left sont ségrégées, l'absence de SlmA au centre de la cellule permettrait la formation de l'anneau FtsZ (**Cho 2011**).

Les sites SBS sont situés à proximité de *loci* où se trouvent des gènes codant pour des protéines membranaires, suggérant une localisation membranaire (périphérie du nucléoïde) des régions possédant un site SBS (**Tonthat 2013**). Les SBS sont deux fois plus présents dans les régions non structurées (NS) que dans la région Origine. Les complexes SlmA/SBS des

régions NS interagiraient plus souvent, vu leur mobilité plus élevée, avec les proto-filaments de FtsZ que les complexes SlmA/SBS des régions Origine et Left (**Espeli 2008, Cho 2011**).

SlmA ne s'étale pas de part et d'autre d'un site SBS où elle se lie en dimère : aucun silencing n'a été observé (**Cho 2013**). La simple présence de manière hétérogène, mais concentrée dans la région autour du site SBS, d'autres dimères de SlmA, permettrait d'augmenter les chances à SlmA d'antagoniser la formation des proto-filaments de FtsZ (**Cho 2013**).

3.4-Organisation et dynamique de Ter

La région Terminale est localisée au nouveau pôle en début de cycle cellulaire et est ensuite déplacée au centre de la cellule pour y être répliquée (**Figure 27**). Comme expliqué précédemment, la migration de la région Terminale au centre de la cellule est marquée par la formation d'un nucléoïde bilobé (**Figure 27, représenté en vert**) (**Bates and Kleckner 2005**). Une fois qu'une région chromosomique est répliquée et après un délai de cohésion, les deux régions néo-répliquées sont ségréguées séquentiellement. Or, une fois répliquée la région Terminale reste au centre de la cellule jusqu'à la toute fin du cycle cellulaire. De ce fait, la région Terminale dispose d'une cohésion supérieure dite « étendue ».

Comme précisé précédemment (**Partie 1.3**), la région Terminale est organisée en une structure compacte dans laquelle les *loci* interagissent préférentiellement les uns avec les autres qu'avec des *loci* en dehors de la région Terminale, l'organisant ainsi en un Macro-Domaine (**Valens 2004**) (**Figure 26B**).

L'analyse de motifs répétés et espacés en moyenne de 35 kb dans la région Terminale a permis de montrer que les séquences *matS* (13 pb) sont des motifs qui peuvent être reconnus par un acteur qui organiserait la région Terminale (**Figure 26B**) (**Mercier 2008**). Les sites *matS* sont situés dans des régions inter-géniques et sont conservés chez de nombreuses bactéries apparentées à *E.coli* (**Mercier 2008**). Le gène *ycbG* code pour une protéine qui se lie au niveau de ces sites *matS* : MatP. Cette protéine est conservée chez les Entérobactéries et les Vibrionacées. MatP possède une structure qui n'est homologue à aucune protéine caractérisée jusqu'à présent. MatP est composée d'un domaine de liaison spécifique à *matS* (N-Ter), d'un domaine central pour la dimérisation et d'un domaine C-Ter pour la condensation via l'interaction de deux dimères entre eux (**Dupaigne 2012**) (**Figure 26C**).

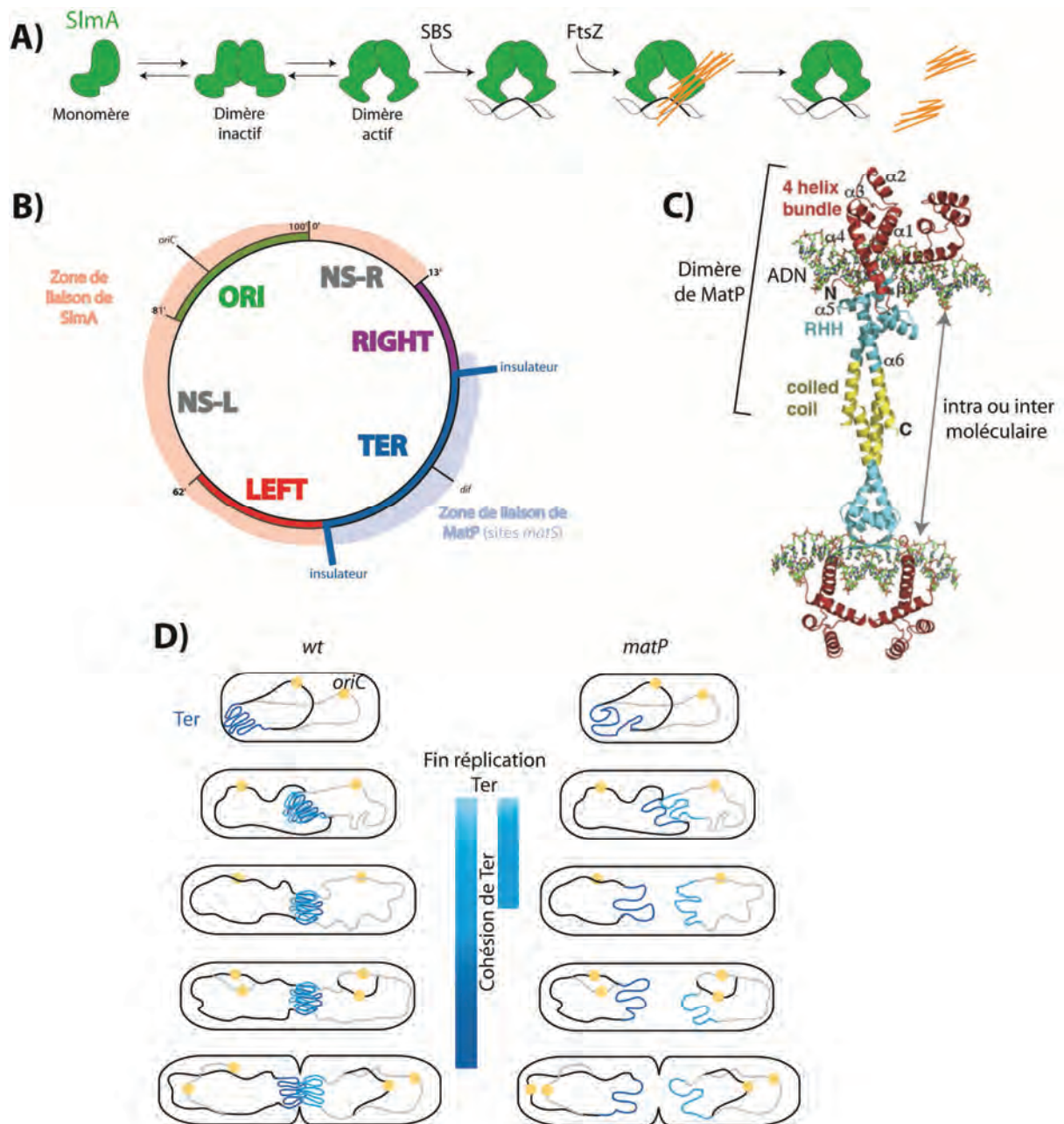


Figure 26 - SlmA et MatP

(A) SlmA est active sous forme dimérique et empêche la formation de l'anneau Z quand elle est fixée sur ses sites SBS. (B) Zones de liaisons des protéines MatP et ZapB. (C) Représentation tétramérique de MatP en liaison sur deux sites matS pour illustrer la condensation d'une telle structure qui rapproche deux sites matS en un même espace. La liaison à l'ADN se fait sous forme dimérique au niveau des régions N-Terminales et l'interaction entre deux dimères se fait via les domaines C-Terminaux. ZapB interagit avec MatP au niveau du domaine C-Ter et empêche ainsi la tétramérisation de MatP. (D) Dynamique de la région Terminale (Bleu) dans une souche sauvage et en l'absence de matP.

Inspiré de Cho 2013, Tonthat 2013, Espeli 2012 et Mercier 2008

L'effet de condensation de MatP sur la région Terminale n'est pas lié, comme pour la majorité des NAPs, à une déformation de l'ADN, mais à sa capacité à se tétramériser (**Figure 26C**). La formation de boucle d'ADN en présence de MatP en AFM (Atomic Force Microscopy), suggère que c'est la tétramérisation de MatP qui condense la région Terminale (**Dupaigne 2012**). On estime que les sites *matS* affectent la localisation et la mobilité d'un *locus* à 40-50kb autour de ce site.

De même la mobilité des *loci* de la région Terminale en absence de MatP augmente de 4 à 5 fois, signifiant que l'organisation en un MD par MatP réduit la mobilité des *foci* présents (**Mercier 2008**). L'effet de MatP dans la région Terminale est limité par la présence d'insulateurs en limite de la région Terminale qui restreindraient l'effet de MatP à la région Terminale (**Figure 26B**). En absence de ces insulateurs, et uniquement lorsque la région Terminale est localisée au centre de la cellule, les *loci* dans les MD Left et Right deviennent moins mobiles (**Thiel 2012**). Deux séquences de 12 pb (*tidL* et *tidR*) ainsi qu'une protéine nécessaire à leur activité (YfbV) ont été identifiés (**Thiel 2012**).

Après réplication, la dynamique de la région Terminale au centre de la cellule dépendrait de : (i) l'interaction MatP-MatP, (ii) l'interaction entre MatP et ZapB, une protéine du divisome, (iii) la résolution tardive des caténanes par la Topoisomérase IV, et (iv) de la translocation par FtsK (**Figure 27**).

(i) L'inactivation de *matP* en condition rapide de croissance provoque la production de cellules anucléées ou de filaments. L'inactivation de *matP* conduit à une ségrégation précoce des *loci* de la région Terminale et à une augmentation de la distance interfocale entre *foci* ségrévés. Dans ce mutant (*matP*-) les *foci* qui sont normalement ségrévés en fin de cycle, sont maintenant ségrévés en même temps que ceux des *loci* des régions Left et Right (**Figure 26D**) (**Mercier 2008**). L'inactivation de *matP* n'affecte pas la localisation / ségrégation des *loci* dans les régions Left et Right. Le rôle de MatP sur la période de cohésion post-répllicative de la région Terminale serait négligable : si l'absence de MatP diminue par 2-3 le temps de co-localisation de *loci* dans la région Terminale sur une même copie du chromosome, elle change peu les interactions physiques entre deux *loci* sur deux copies du chromosome (**Lesterlin 2012**).

(ii) ZapB est un acteur de l'anneau Z et le stabilise (**Ebersbach 2008, Galli 2011**) (**Figure 22B, 27**). Le rôle de ZapB ne se limite pas à être une simple passerelle nécessaire pour l'interaction entre ZapA et FtsZ. Très récemment, il a été montré que ZapB et MatP

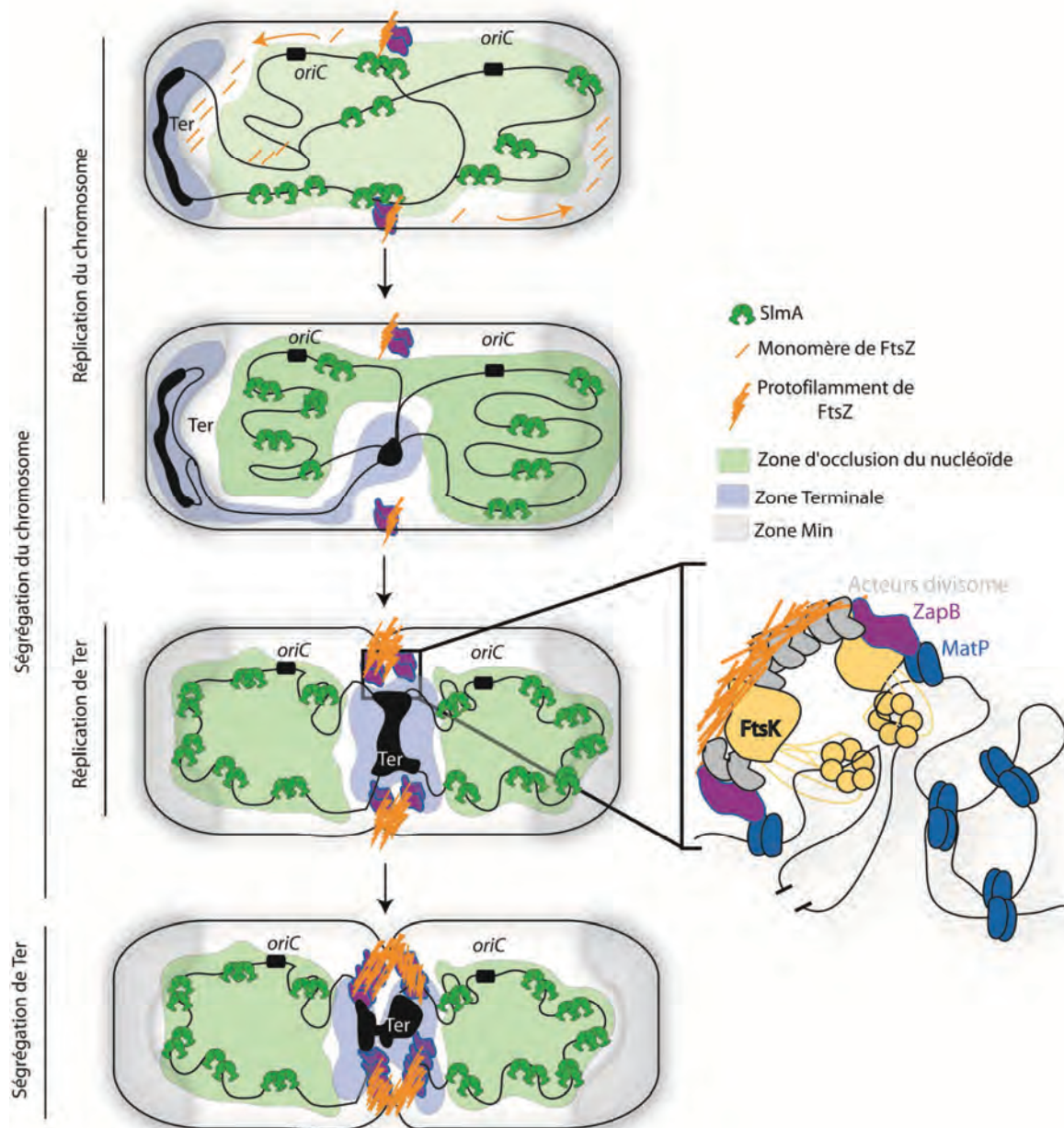


Figure 27 - Dynamique de la région Terminale.

En début de cycle cellulaire quand la région Terminale est au nouveau pôle, les autres régions du chromosome sont répliquées et la présence de SlmA au centre inhibe la formation de l'anneau Z tandis que la présence des protéines Min aux pôles inhibe la septation dans ces régions. La région Terminale est déplacée au centre de la cellule pour y être répliquée. Ce déplacement s'effectue progressivement et cette migration au centre chasse les régions de liaison de SlmA de manière à permettre la formation de l'anneau Z au centre de la cellule. MatP peut alors interagir avec ZapB et maintient la région Terminale au centre qui après réplication est ségréguée progressivement jusqu'à la formation finale du septum de division.

interagissent physiquement, de manière à ce que ZapB localise MatP (Région Terminale) au centre de la cellule (**Espeli 2012**). En l'absence de *zapB*, la condensation de la région Terminale n'est pas affectée ; seule la localisation de la région Terminale est altérée même si de nombreuses cellules disposent toujours d'une localisation de la région Terminale au centre de la cellule (**Espeli 2012**). L'interaction ZapB/MatP est nécessaire pour une co-localisation prolongée (cohésion) de la région Terminale néo-répliquée au centre de la cellule (**Espeli 2012**) (**Figure 27**). Un double mutant *matP/ZapB* affecte grandement la ségrégation de la région Terminale, suggérant une synergie dans le rôle de ces deux protéines pour le mécanisme de ségrégation (**Espeli 2012**).

(iii) MatP maintiendrait la région Terminale condensée, mais la cohésion prolongée de la région Terminale ne serait pas due à MatP, mais à la présence de liens comme les caténanes qui s'accumuleraient après la réplication de la région Terminale (**Lesterlin 2012**) (**Figure 12,14**). Aucune évidence franche du rôle des caténanes dans le positionnement de la région Terminale au centre de la cellule n'ont été décrites jusqu'à présent. On ne sait pas non plus à quel moment de la fin du cycle cellulaire sont résolus les caténanes.

(iv) Jusqu'à présent, la translocation de FtsK n'a été montrée comme importante, que pour la résolution des dimères de chromosome. Cependant, l'activité de translocation de FtsK pourrait se faire sur tous les chromosomes (dimères et monomères) et donc participer à la dynamique de la région Terminale une fois le septum formé.

Les premières analyses de la ségrégation de la région Terminale remontent à 10 ans (**Li 2002, Lau 2003, Li 2003**). Dans ces travaux, il a été montré que la cohésion de la région Terminale est élevée (mesure du pourcentage de cellule avec un *focus*). Les *loci* frères dans la région Terminale restent localisés longtemps sous la forme d'un *focus* et sont ségrégés en toute fin du cycle cellulaire. Cependant la résolution des techniques utilisées était trop faible pour déterminer un quelconque profil de ségrégation des *loci* marqués dans la région Terminale. De même aucun acteur dans la ségrégation de la région Terminale n'a été caractérisé précisément. Ces dernières années, la localisation de la région Terminale a été montrée comme étant périphérique au nucléoïde de manière à ce que, comme décrit dans les modèles de ségrégation précédant, la région Terminale joue le rôle de jonction étendue entre les deux chromosomes lorsque la région Terminale n'a pas été répliquée. Cependant, les limites propres à la microscopie, et surtout l'absence de système de marquage suffisamment fiable pour ne pas modifier la cohésion locale d'un *locus*, ont longtemps limité l'analyse de la ségrégation de la région Terminale.

II-Résultats Préliminaires et Objectifs de Thèse

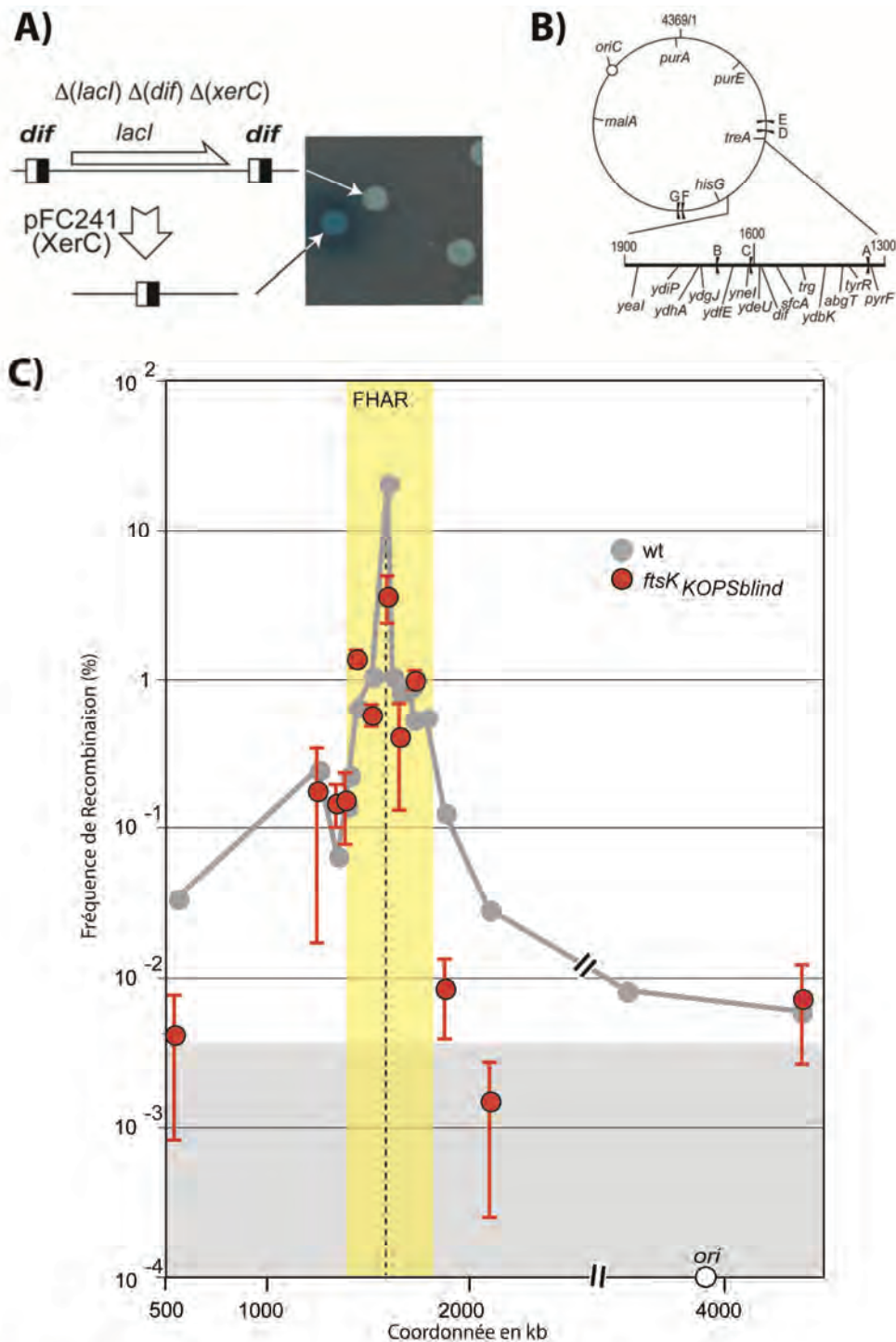


Figure 28 - Résultats préliminaires

(A) Système de recombinaison utilisé pour définir la FHAR. Quand FtsK transloque l'ADN, elle active la recombinaison XerCD dépendante au niveau des sites *dif*. Le gène *lacI* est alors perdu et la synthèse du gène *lacZ* activé de manière à créer des colonies bleues en présence de X-Gal. **(B)** Loci chromosomiques dans la région terminale qui ont été marqués avec la cassette de recombinaison *dif-lacI-dif*. **(C)** Efficacité de recombinaison dans la souche sauvage (gris) et quand FtsK ne peut plus reconnaître les KOPS (rouge).

1 - Derniers travaux de l'équipe sur la ségrégation de la région Terminale.

Récemment, nous avons montré que la région Terminale est organisée en périphérie du nucléoïde (Meile 2011, Publication en annexe I). La région Terminale possède une localisation périphérique qui ne dépend pas d'une étape particulière du cycle cellulaire. La région Terminale est située préférentiellement en périphérie au nouveau pôle et au centre de la cellule. En début de cycle cellulaire, la région Terminale est située au nouveau pôle de la cellule et migre ensuite au centre de la cellule pour y être répliquée. La migration de la région Terminale au centre de la cellule se fait progressivement. L'ordre de migration de ces *loci* au centre de la cellule se fait selon l'ordre de réplication (sur la carte génétique), en premier les plus proches des Macro Domaines Left et Right puis les plus éloignés (Espeli 2012). Une fois le divisome formé, la région Terminale interagit via MatP, avec ZapB qui est une protéine associée au divisome, et qui maintient cette région en périphérie au centre de la cellule.

Nous avons récemment montré que l'activité de la translocase à ADN, FtsK, est réduite à une région autour du site *dif* (Deghorain 2011, Publication annexe II). Le taux de recombinaison d'une cassette *dif-lacI-dif* (dans une souche *lacI-*, *dif-* et *xerC-* portant un plasmide produisant XerC : pFC241), insérée à différentes positions de la région Terminale, a été mesuré (Figure 28AB). Ce crible génétique permet de mesurer le taux de recombinaison induit par FtsK. L'activité de FtsK est restreinte à une zone de 400kb autour du site *dif* et est nommée FHAR (FtsK High Activity Region). L'activité de FtsK dans cette région dépend de sa capacité à transloquer l'ADN et non de l'orientation de l'activité de translocation. En effet, quand FtsK ne peut plus reconnaître les KOPS (points rouges, Figure 28C), le taux de recombinaison est le même en dehors et dans la FHAR. Un changement de la terminaison de la réplication par l'ajout d'un nouveau terminateur de réplication, qui réduit la fenêtre de la fin de réplication à 50kb en dehors de la FHAR (au lieu de 300kb environ dans la FHAR), ne change pas l'activité de FtsK dans la FHAR. L'activité de FtsK est donc régulée par des acteurs post-réplicatifs. Nous avons aussi montré qu'il existe un ordre de ségrégation particulier dans la région Terminale qui sépare la ségrégation des *loci* dans, et en dehors de la FHAR. Les *loci* de la FHAR semblent être ségrégés dans la même fenêtre de temps en toute fin du cycle cellulaire.

2 - Objectif de Thèse

La dynamique du chromosome d'*Escherichia coli* est différente des autres bactéries étudiées comme *B.subtilis*, *V.cholerae*, *P.aeruginosa* ou *C.crescentus* : *E. coli* ne dispose pas de système Par et la compréhension des mécanismes de ségrégation du chromosome est encore inconnue à ce jour. La seule translocase à ADN présente chez *E. coli*, nommée FtsK, n'est essentielle pour la survie de la cellule, que pour l'assemblage du septum. FtsK n'a été caractérisé jusqu'à présent, que pour la ségrégation des chromosomes dimériques.

Des travaux récents montrent que la ségrégation des chromosomes s'effectue via des forces qui, soit s'accumulent dans des zones précises du nucléoïde et qui mènent à la ségrégation de grands fragments du nucléoïde lorsque ces forces sont relâchées (**Fisher 2013**), soit par la perte progressive de forces qui sont présentes au sein des domaines topologiques (**Jun and Wright 2010**). Les régions Origine et Terminale disposent d'une dynamique plus complexe que les autres régions du chromosome. La région Origine a longtemps été supposée comme étant la région qui donne la force de ségrégation au reste du chromosome sur la supposition de la présence d'une ou plusieurs séquences centromérique de type *parS* dans cette région. Une séquence centromérique nommée *migS* découverte dans la région Origine, ne permet que de localiser spécifiquement les régions Origine aux positions $\frac{1}{4}$ et $\frac{3}{4}$ dans la cellule. Cette localisation spécifique de la région Origine ne donne pas les forces nécessaires à la ségrégation du reste du chromosome.

La région Terminale est la dernière à être répliquée puisque les sites de terminaison de la réplication se trouvent dans cette région. Il est supposé que la symétrie *ori/dif* permet à la réplication de se terminer préférentiellement autour du site *dif* par fusion/collision des fourches de réplication (**Higgins 2007**). De plus, c'est dans la région Terminale et au niveau du site *dif* que sont résolus les dimères de chromosomes. La région Terminale est la seule qui possède une organisation condensée dépendante d'une unique protéine, MatP. Elle est aussi la seule qui possède une localisation post-réplivative étendue au centre de la cellule dépendante de l'interaction avec un acteur du divisome, ZapB. C'est au niveau de la région Terminale que s'accumuleraient les caténanes formés en fin de réplication, ce qui pourrait retarder la ségrégation de cette région.

Toutes ces propriétés, montrent que la région Terminale est vraiment différente des autres régions du chromosome. Si la ségrégation des autres régions du chromosome est ordonnée et suit l'ordre des gènes sur la carte génétique hormis certaines régions comme les SNAPs (**Joshi 2011**), nous ne savons pas comment est ségrégée la région Terminale.

Au vu de la complexité des mécanismes ayant lieu dans la région Terminale en fin du cycle cellulaire, la ségrégation de cette région doit être dépendante de points de contrôles particuliers qui sont à définir puisque les dernières analyses de la ségrégation de plusieurs *loci* de cette région sont imprécises (**Li 2003**).

Dans ce contexte, l'objectif principal de ma thèse était de caractériser le profil de ségrégation de la région Terminale et les acteurs intervenant dans cette ségrégation.

Mes objectifs étaient de répondre à ces questions :

(i) Quel est le rôle de FtsK sur les chromosomes monomériques ? FtsK ne peut pas différencier un monomère d'un dimère lorsqu'elle transloque l'ADN puisque les deux disposent de KOPS. Or, l'activité de FtsK n'a été caractérisée que sur des dimères.

(ii) Comment s'effectue la ségrégation de la FHAR avec toutes les contraintes topologiques présentes ? On sait que la ségrégation de tout le chromosome est ordonnée et progressive et suit l'ordre de répllication des *loci*. Comment est ségrégée la région Terminale si les contraintes topologiques y sont plus importantes et si la localisation de cette région est différente du reste du chromosome ?

(iii) On sait qu'un changement de la fin de répllication du chromosome, n'affecte pas le timing de ségrégation des *loci* dans la FHAR (**Deghorain 2011**). Quels sont les acteurs post-répllicatifs responsables de la ségrégation de cette région ? Est-ce que FtsK permet la ségrégation de cette région ou bien d'autres acteurs interviennent ?

(iv) Quelle est la chorégraphie de la région Terminale au cours du cycle ? L'objectif posé par cette question est d'éclairer le rôle du positionnement de la région Terminale dans la dynamique de tout le nucléoïde en étudiant la dynamique des principaux Macro Domaines du chromosome dans des contextes où l'occlusion par le nucléoïde n'est plus présente (*slmA*-) ou quand la région Terminale n'est plus organisée (*matP*-).

III-Résultats

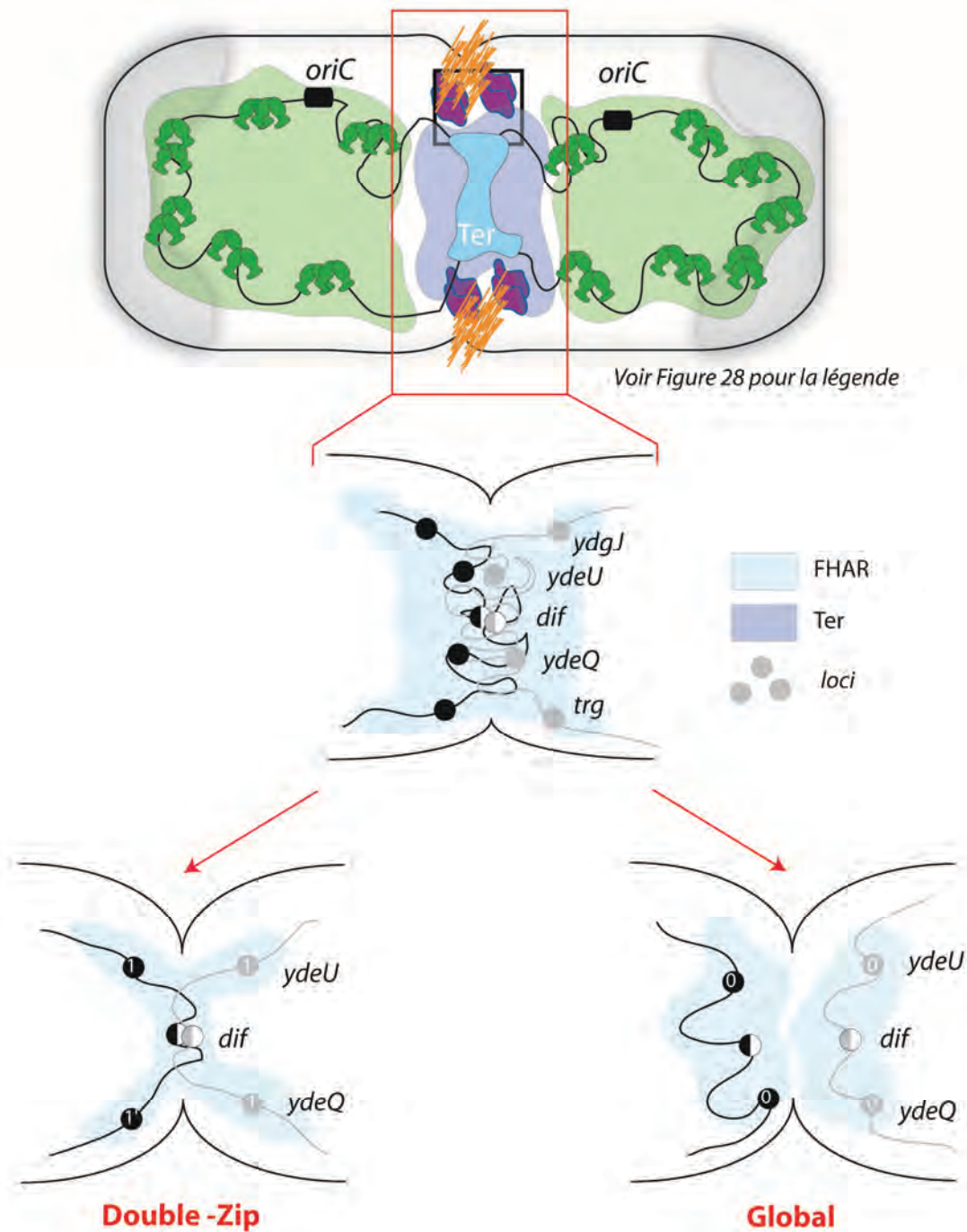


Figure 29 - Hypothèses de ségrégation de la FHAR

Une fois la région de forte activité de FtsK au centre de la cellule, comment sont ségrégés les *loci* de cette région ? A-t-on une ségrégation progressive des *loci* en direction du site *dif* comme le modèle en Double-Zip ? Ou la ségrégation de cette région s'effectue par un relâchement Global de la cohésion étendue de la FHAR ? Une troisième possibilité serait que la ségrégation ne soit ni progressive, ni globale, mais aléatoire.

En début de cette partie, je présente les notions et méthodes nécessaires pour comprendre comment ont été construites les souches que j'ai utilisées au cours de mes travaux de thèse, et comment j'ai caractérisé des systèmes d'expression et conditions de croissance optimales pour la visualisation de *loci* en microscopie à fluorescence.

Les données relatives à mes travaux sur l'étude de l'ordre de ségrégation de la région Terminale médiée par FtsK et MatP sont détaillées par la suite. Je présente en premier mon travail principal de thèse qui a été publié en 2013 en format de publication. En description supplémentaire de ce travail, je présente un modèle plausible du rôle de FtsK dans la ségrégation de la région Terminale. Je présente aussi des résultats complémentaires non détaillés dans la publication pour étayer le modèle décrit. Ces résultats complémentaires précisent d'avantage la dynamique de la région Terminale et de la FHAR quand FtsK n'a plus une activité orientée sur le chromosome.

Dans une dernière partie, je décris le rôle des acteurs MatP et SlmA dans l'organisation de la région Terminale et les conséquences de la désorganisation de cette région sur la dynamique de tout le nucléoïde.

1-Résultats préliminaires de Thèse et Méthodes.

Quand j'ai commencé les travaux préliminaires à ma thèse dans l'équipe de François Cornet, nos objectifs étaient d'utiliser un système à deux couleurs pour marquer des *loci* dans la région Terminale et étudier leur profil de ségrégation *in vivo* et au cours du temps. Malgré la cohésion étendue (Cf partie introduction 2.3), et les activités présentes à la fin du cycle cellulaire dans cette région (résolution des dimères, résolution des caténanes), nous estimions que la ségrégation de la région Terminale pouvait s'effectuer de trois manières. (i) Soit par un relâchement progressif de la cohésion de l'extérieur en direction du site *dif* qui serait alors le dernier point de contact entre les deux chromosomes frère, (ii) soit par un relâchement abrupt de la cohésion suite à la perte d'une contrainte importante dans la région (**Figure 29**). Dans le premier cas les *loci* sont ségrégés selon un ordre précis, dans le deuxième, ils sont ségrégés tous en même temps. (iii) Une troisième possibilité, (non décrite Figure 29), serait que la ségrégation puisse être aléatoire.

La microscopie à fluorescence a été utilisée pour analyser le profil de ségrégation de *loci* dans la région Terminale. Pour cela, nous avons construit des souches possédant deux *loci* marqués : l'un à proximité du site *dif* et l'autre éloigné de manière à savoir quel *locus* est

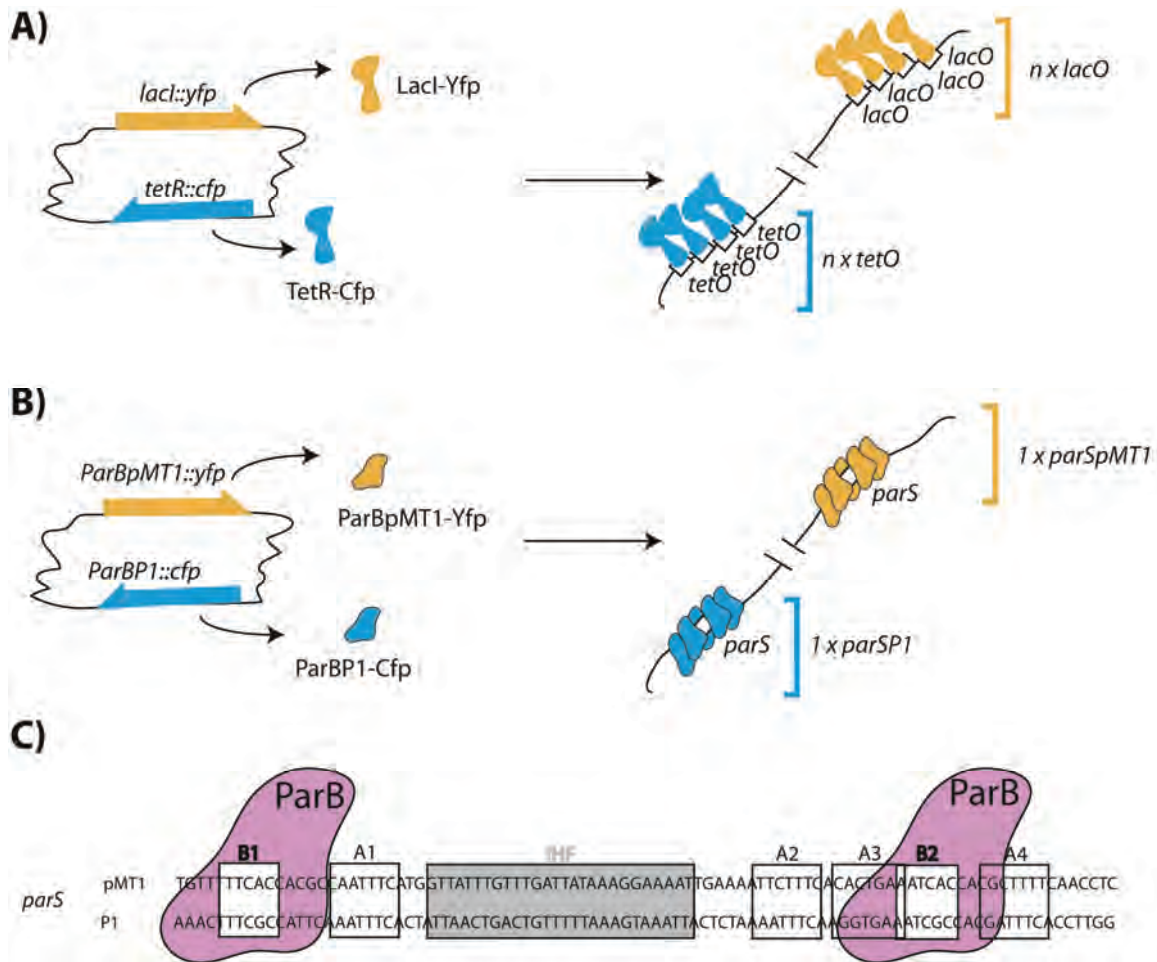


Figure 30 - Systèmes de marquage de loci chromosomiques.

Pour observer un *locus* en microscopie à fluorescence dans les cellules non fixées, deux méthodes sont possibles. **(A)** L'insertion de multiples séquences d'opérateurs bactériens *tetO* et/ou *lacO* et leur reconnaissance par leurs répresseurs spécifiques TetR et LacI fusionnés avec fluorophore permet d'observer la localisation d'un ou deux *foci*. **(B)** L'insertion d'une seule séquence *parS*-*P1* et/ou *pMT1* à un *locus* donné et la reconnaissance de cette séquence par la protéine ParB-*P1* et/ou *pMT1* permet la visualisation d'un ou deux *foci* en microscopie à fluorescence. **(C)** Séquences *parS*-*P1* et *pMT1* avec les sites de fixation (B1 et B2) pour les protéines ParB (en dimère sur chaque site *parS*) et avec le site de liaison à IHF représenté.

ségrégué avant lequel et d'établir un ordre plus précis que ce qui a été décrit précédemment (**Li 2003**). Nous avons décidé de marquer ces *loci* sans altérer le contexte sauvage du *locus*, même si dans la région Terminale les gènes présents ne sont pas essentiels. Nous avons décidé d'insérer le marqueur d'un *locus* entre deux gènes convergeants, pour ne pas altérer l'environnement des régions promotrices. Quatre *loci* ont été choisis pour être marqués et localisés en microscopie à fluorescence. Ces *loci* sont les suivants : {*ydgJ-ydgT*} et {*ydeU-ydeK*} d'un côté du site *dif* à 110 et 5 kb et de l'autre côté du site *dif* les *loci* {*ydep-ydeQ*} et {*trg-ycdL*} à 5 et 100 kb (**Figure 29**). Dans les travaux décrits précédemment (**Meile 2011 et Deghorain 2011, Annexe I et II**), les *loci* marqués l'ont été en supprimant un gène non essentiel et sans possibilité de supprimer la cassette de résistance qui a permis l'insertion.

1.1-Comment localiser un *locus* chromosomique ?

Il existe trois systèmes pour marquer des *loci* chromosomiques et observer les souches en microscopie à fluorescence : (i) FISH (Fluorescente In Situ Hybridization), (ii) FROS (Fluorescent Repressor Operator System) et ParB/*parS* (Cf partie introduction II sur les systèmes Par) (**Figure 30**). Nous avons décidé d'utiliser le système ParB/*parS* (**Figure 30B**). Ce système consiste en la reconnaissance spécifique d'un site *parS* par une protéine ParB. D'autres protéines ParB s'étalent de part et d'autre de la première protéine ParB fixée sur le site *parS* (**Figure 30C**). La séquence *parS* est courte, mais variable (20 à 80pb) selon la présence de motifs supplémentaires dans sa séquence, comme la présence d'un site de liaison d'IHF (Cf Partie 1 sur les protéines associées au nucléoïde). Le système ParB/*parS* a été utilisé en premier pour marquer des *loci* chromosomiques avec le système ParB/*parS* dérivé du phage P1 (**Li et Austin 2002**). Le fluorophore Gfp, est fusionné en N-Ter de ParBP1 (ParBP1 sans ses 30 premiers acides aminés, plasmide pALA2705). L'insertion d'une séquence *parS* sur le chromosome, et l'expression ectopique de Gfp-ParBP1, permet de localiser *in vivo* un *locus* chromosomique. Ce système ne nécessite pas la fixation des cellules comme avec le système FISH. Le système ParB/*parS* crée des *foci* qui sont plus précis que le système FISH. Pour observer un deuxième *locus* chromosomique, le système ParB/*parS* du plasmide pMT1 peut être utilisé (ParB sans ses 23 premiers acides aminés) (**Nielson 2006**). Les deux systèmes ParB/*parS* P1 et pMT1 peuvent être exprimés sur le même plasmide (pFHC2973) avec deux fluorophores différents (respectivement Cfp et Yfp) (**Nielsen 2006**) (**Figure 30B**). Avec un tel plasmide, on peut donc analyser la localisation de deux *loci* chromosomique différents *in vivo*.

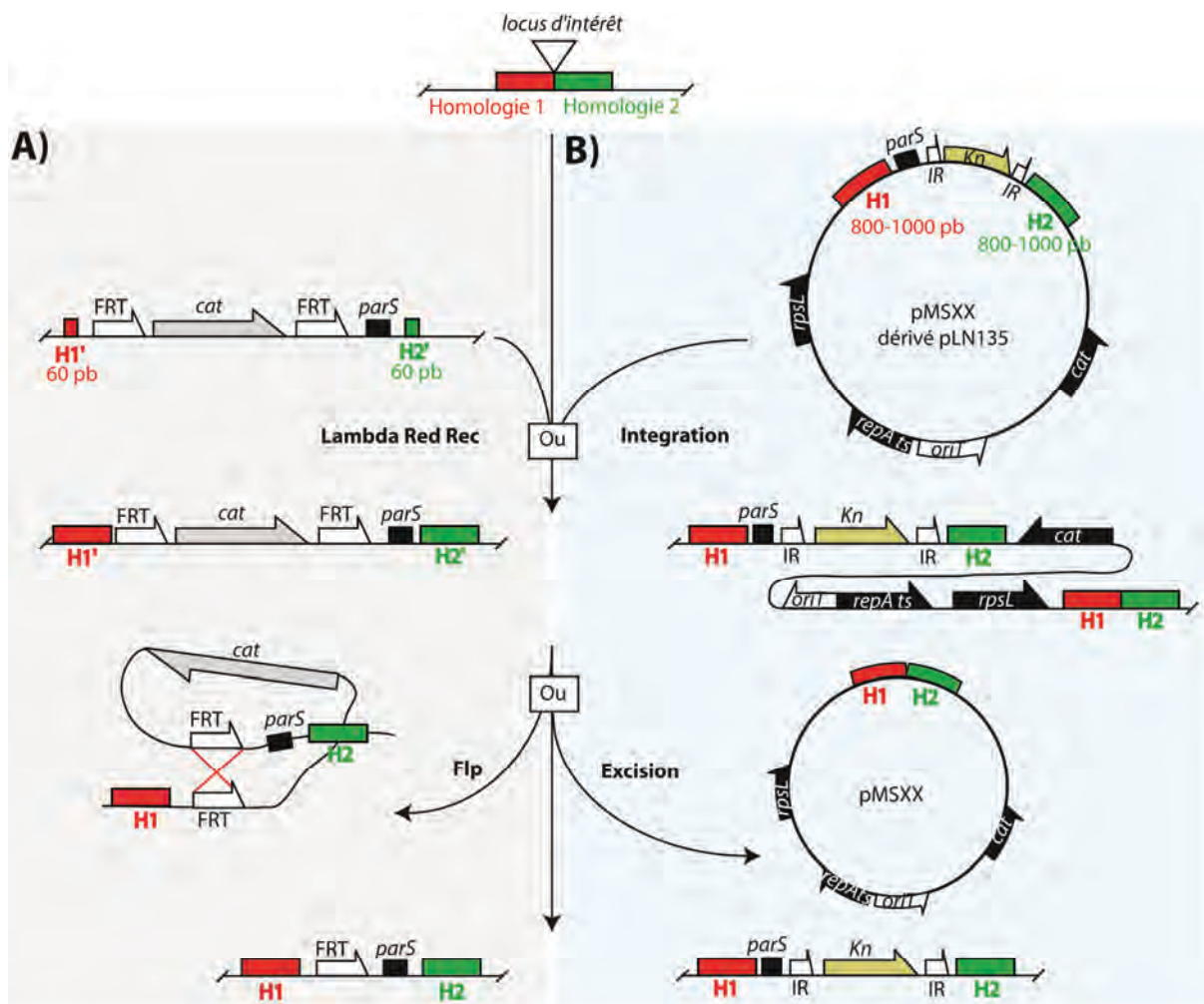


Figure 31 - Systèmes de recombinaison utilisés pour marquer des *loci* sur le chromosome

Principe de marquage d'un *locus* chromosomique. **(A)** Via le système de recombinaison du Lambda Red, un produit PCR avec deux homologies de 50-60 pb est transformé dans une souche puis via l'expression des gènes de ce système pour inhiber la dégradation de l'ADNsb et permettre la recombinaison sont exprimés. L'utilisation de FLP permet de perdre la cassette de résistance (*cat*, *Cm*) dans notre système. **(B)** Utilisation d'un plasmide dérivé du pLN135 avec deux régions d'homologies de 800-1000pb avec une cassette possédant un site *parS* et le gène de résistance à la kanamycine (*Kn*). L'intégration se fait par recombinaison homologue à 42°C : le plasmide possède une origine thermo sensible qui l'oblige à s'intégrer sur le chromosome pour ne pas être perdu. En présence de streptomycine, le plasmide est excisé car le gène *rpsL* sauvage sur le plasmide est dominant sur le gène *rpsL** sur le chromosome (*rpsL* ne donne pas la résistance à la St, seul *rpsL** la donne). Les sites IR permettent de perdre la cassette de résistance avec l'expression de Tnpl, cependant je n'ai pas construit pendant ma thèse de plasmide pour permettre la perte de cette résistance.

Le système nommé FROS (Fluorescent Repressor Operator System) a été le premier utilisé pour la localisation de *loci in vivo* (**Gordon 1997**) (**Figure 30A**). Il consiste en l'insertion de répétitions d'opérateurs bactériens (*tetO*, *lacO*). Ces répétitions d'opérateurs sont reconnues par des répresseurs spécifiques (TetR, LacI), fusionnés avec un fluorophore. Ces deux systèmes *tetO*/TetR et *lacO*/LacI sont décrits comme étant instables (auto-recombinaisons entre opérateurs). Le nombre de répétitions nécessaires pour visualiser un signal en microscopie à fluorescence, dépasse les 100 copies d'opérateur (plus de 240 dans certains cas), de manière à avoir des inserts de plus de 5 kb. Ces répétitions ralentissent le passage des fourches de réplication ce qui altère, sans présence d'un atténuateur comme l'anhydro-tétracycline, les paramètres du cycle cellulaire. Le système ParB/*parS* dispose lui aussi d'un inconvénient majeur (décrit plus tard) que nous avons caractérisé au laboratoire et qui n'était pas clairement décrit dans la littérature.

1.2-Principe du système de recombinaison homologue utilisé

Pour insérer les séquences *parS* (**Figure 30C**) sur le chromosome à des positions spécifiques, nous avons utilisé différents systèmes de recombinaison homologue. Au cours de mes travaux préliminaires, je devais sous la direction de Jean-Christophe Meile, mettre en place dans le laboratoire, le système de recombinaison homologue décrit par Datsenko (**Datsenko 2000**) (**Figure 31A**). Ce système consiste en la recombinaison homologue de produits PCR linéaires via un système de recombinase dérivé du phage Lambda : Lambda Red Recombinase. En fait, *E. coli* possède une exonucléase qui dégrade systématiquement l'ADN simple brin. Le système Lambda Red Rec dispose de trois gènes qui permettent d'inhiber l'action de l'exonucléase, tout en permettant la recombinaison homologue des ADN simples brins. Cette recombinaison homologue nécessite des inserts PCR avec des régions d'homologie de 50pb (**Figure 31A**). Cependant, au cours de mes travaux préliminaires, ce système s'est avéré peu efficace dans nos conditions. Un plasmide thermosensible (pKD46) nécessaire pour l'expression des gènes du système, n'a pas permis d'avoir un taux de recombinaison élevé avec la souche modèle du laboratoire utilisée (LN2666) : l'expression thermosensible des gènes du Lambda Red est limitée dans le temps étant donné qu'à haute température, le plasmide est perdu.

Pour sélectionner les clones avec le site *parS* inséré au *locus* d'intérêt, nous avons ajouté une cassette de résistance qui peut être perdue après insertion, de manière à ne pas altérer le niveau transcriptionnel du *locus* marqué. Pour perdre la cassette de résistance à

l'antibiotique, nous avons décidé d'utiliser la recombinaison site spécifique FRT/FLP. Les plasmides pGBKD3-P1 et pGBKD3-pMT1 disposent d'un site *parSP1/pMT1* et d'une cassette FRT-Cm-FRT (Cm = chloramphénicol). L'expression du gène codant pour la protéine FLP sur le pCP20 (ou pFLP), permet la recombinaison entre les deux sites FRT et la perte de la cassette de résistance.

Comme expliqué, la recombinaison Lambda Red s'est avérée peu efficace dans nos conditions. Nous avons décidé alors d'utiliser le système d'intégration / excision dérivé du pSC101 (Cornet 1994, Cornet 1996). Ce système a été développé au laboratoire et s'est avéré être le système le plus efficace pour marquer un *locus* chromosomique ou pour insérer une construction autre à un *locus* donné. Ici, les deux régions d'homologies nécessaires mesurent de 800 à 1000 pb (Figure 31B). Un plasmide dérivé du pSC101 dispose d'un site de clonage multiple permettant l'insertion simple des deux régions d'homologies : la cassette {*parSP1/pMT1* FRT-Cm-FRT} est utilisée et insérée entre les deux régions d'homologie. Ce système d'intégration / excision ne nécessite pas la présence d'une cassette de résistance pour sélectionner l'insert par la suite.

En fin de thèse, l'utilisation d'une cassette chromosomique disposant des gènes nécessaires au système Lambda Red dans une souche spécifique (DY378, Daiguan 2000) s'est avérée être plus efficace de tous les systèmes utilisés de part sa simple utilisation avec l'utilisation des nouveaux kits de clonage (In Fusion, Ozyme).

1.3-Analyse en microscopie à fluorescence et principe.

Les souches construites avec un ou deux *parS* chromosomique ont été analysées avec respectivement, soit le pALA2705 (*gfp::parBPI*), soit le pFHC2973 (*cfp::parBPI*, *yfp::parBpMT1*). Les souches ont été cultivées dans du M9 Glycérol avec des CSA (Casamino Acides) à 30°C comme précédemment (Meile 2011, Deghorain 2011). Les cellules ont été cultivées jusqu'à une absorbance (600nm) de 0,2-0,4 puis déposées sur lame d'agarose (1%, milieu de croissance) et recouvert d'une lamelle. Dans ces conditions et tout au long de mes travaux (préliminaires et pendant la thèse), aucune population n'a été synchronisée pour l'analyse en microscopie. C'est-à-dire, que toutes les étapes du cycle cellulaire sont présentes en un même plan en microscopie à fluorescence.

Au cours de ces travaux, nous nous sommes rendu compte que les conditions dans lesquelles les souches étaient observées en microscopie n'étaient pas optimales pour l'analyse de l'ordre de ségrégation. D'une part, le milieu M9 Glycérol CSA (ou sans CSA) à 30°C, est trop riche pour n'avoir qu'un seul cycle répliatif par génération. Même pour un *locus* marqué dans la région Terminale, un certain nombre de cellules disposait de plus de deux *foci*, suggérant plus de deux copies d'un même *locus*. D'autre part, le problème majeur de ces analyses a été l'observation d'une cohésion induite par le système ParB/*parS*. Il s'est avéré que pour un *locus* marqué avec le système ParB/*parS* P1 et pMT1 dans deux souches différentes, le pourcentage de cellule avec un *focus* (cellules dont le *locus* n'a pas été ségrégué) est différent. Il est 30% plus important avec le système ParB/*parS* P1 (**Figure 32A**).

De ce fait, les résultats préliminaires ne nous ont pas permis d'établir des conclusions sur le profil de ségrégation de la région Terminale. La résolution de ces problèmes pour disposer d'un système de marquage sans artéfacts a été ma priorité de début de thèse ainsi que la nécessité de trouver des conditions de croissance sans cycles répliatifs chevauchants.

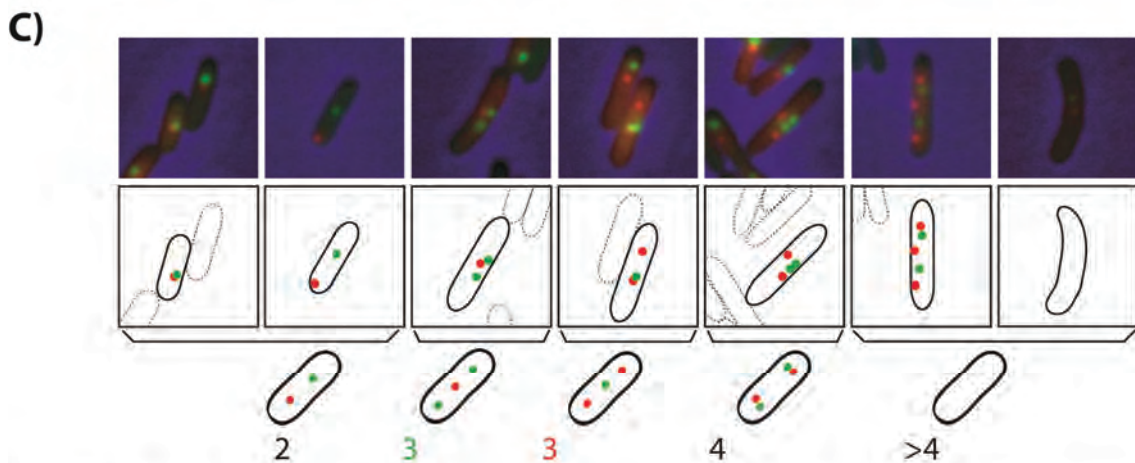
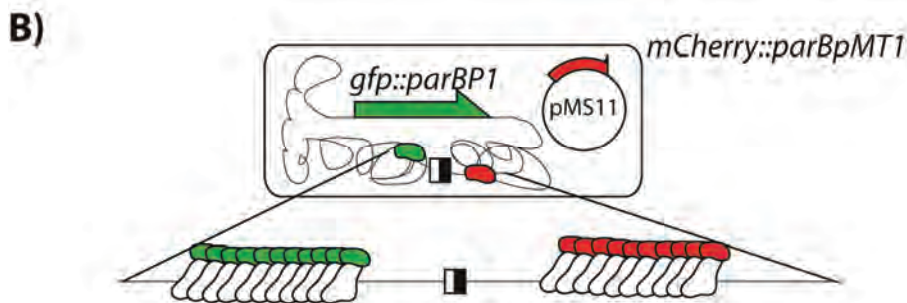
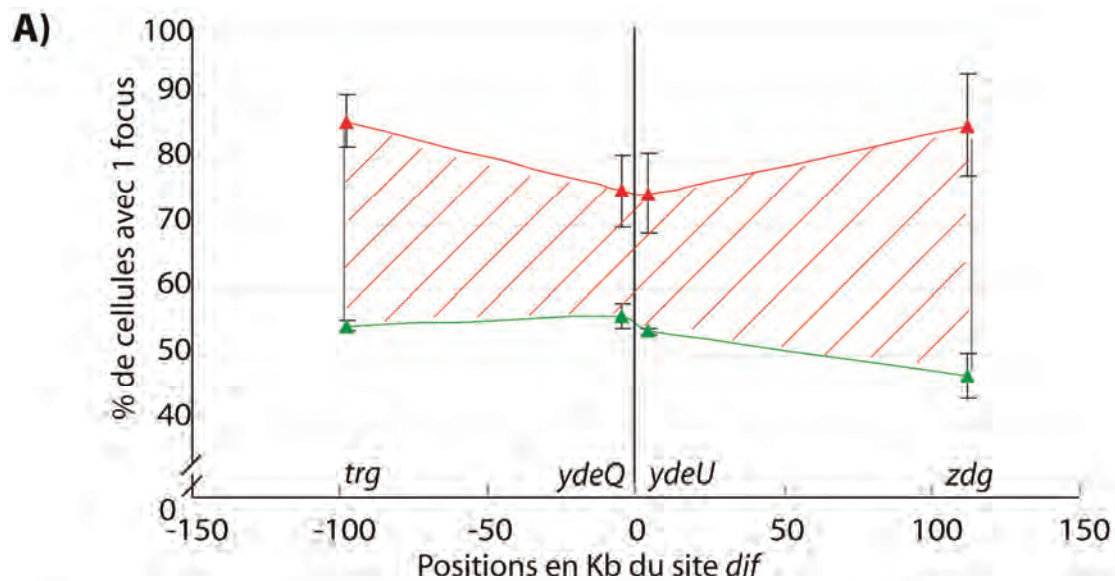


Figure 32 - Résultats pré-thèse

(A) Le pourcentage de cellules avec 1 *focus* pour un *locus* marqué dans une population de cellules non synchronisées a été mesuré pour chaque système ParB utilisé (P1 en Rouge et pMT1 en Vert). La différence entre les deux systèmes est représentée en rouge par des hachures. Le plasmide pFHC2973 a été utilisé dans cette expérience. (B) Représentation du système ParB/*parSP1* sur le chromosome et du système ParB/*parSpMT1* sur le plasmide pMS11. (C) Représentation des cinq différentes catégories de cellules observées dans une cellule avec deux *locis* marqués en conditions lentes de croissance.

2-FtsK ségrège activement la région Terminale.

L'objectif principal de mes travaux de début de thèse était de caractériser le profil de ségrégation de la région Terminale du chromosome d'*E. coli*. Pour cela et dans la continuité des résultats préliminaires, j'ai développé en début de thèse un système d'expression ParB/*parS* contrôlé qui permet de s'affranchir de la cohésion induite par ce système. La recherche de conditions de croissance lente pour ne plus avoir de cycles chevauchants a aussi été une priorité. Nos questions étaient les suivantes :

(i) Quel est le profil de ségrégation de la région Terminale et de la FHAR ? A-t-on une ségrégation orientée et progressive en direction d'un site précis ? Ou bien, le relâchement de la cohésion de la région Terminale se fait de manière soudaine et globale ? (**Figure 29**)

(ii) Est-ce que la région autour du site *dif* est le dernier point de contact entre les deux chromosomes frères ? Ou bien, est ce que justement par un relâchement global de la cohésion, il n'y a pas de dernier point de contact seul mais plusieurs ?

(iii) Quels sont les acteurs qui permettent le relâchement de la cohésion de manière progressive et globale ?

Les résultats préliminaires suggéraient, une fois un coefficient de correction pour la cohésion induite par le système ParB/*parS* P1 apporté, que l'ordre de ségrégation est progressif, orienté et dirigé vers le site *dif*. Nos hypothèses principales en début de thèse étaient dans la continuité des résultats préliminaires :

(i) Le profil de ségrégation serait progressif, selon un modèle en double Zip,

(ii) La région autour du site *dif* serait le dernier point de contact entre les deux chromosomes frères,

(iii) Des acteurs post-réplicatifs comme FtsK, MatP, TopoIV et / ou ZapB joueraient un rôle dans le profil de ségrégation de cette région.

2.1-Constructions de système ParB/*parS* sans cohésion supplémentaire induite.

Comme décrit précédemment, le système ParB/*parS* P1 induit une cohésion supplémentaire. Ce système a été utilisé dans de nombreux travaux depuis 2002 (**Austin 2002, Li 2002, Li 2003, Nielsen 2006a, Nielsen 2006b**). Dans certains de ces travaux, l'expression des protéines Gfp-ParBP1, CFP-ParBP1 et Yfp-ParBPMT1, a été induite par l'ajout d'IPTG, ce qui augmente considérablement la quantité de protéine ParB dans la

cellule. Dans un de ces travaux, il a été observé que l'induction avec de l'IPTG pouvait être responsable du problème de sur-cohésion observé (Nielsen 2006a). Cependant, même sans IPTG, nous avons toujours observé une sur-cohésion. Notre hypothèse principale, était que la sur-cohésion provenait du nombre de copie du gène codant pour la fusion *gfp::parBP1* (pALA2705, Li 2002). Dans le cas du pFHC2973 (Nielsen 2006a), nous avons supposé qu'étant donné que les gènes *cfp::parBP1* et *yfp::parBpMT1* sont tous deux sous le contrôle du même promoteur (*plac* inductible à l'IPTG) le premier gène transcrit est celui qui est exprimé le plus efficacement.

Nous avons donc inséré par recombinaison homologue (en utilisant le système décrit précédemment dérivé du pLN135) une fusion *gfp::parBP1* à la place du gène *lacZ* au *locus* chromosomique. Afin d'optimiser le système, la nature du linker a été changée mais la matrice pour les PCR reste le pALA2705. La souche obtenue (MS112) est la souche mère de toutes mes constructions avec un ou deux *loci* marqués. Une ou deux copies de ce *locus* (en fonction du cycle cellulaire) sont suffisants, en présence de 50µM d'IPTG, pour observer un *locus* chromosomique en microscopie à fluorescence (sans IPTG, le *focus* n'est pas visible).

Pour observer un deuxième *locus* en microscopie, nous avons la possibilité d'utiliser l'opéron *araBAD* de la souche MS112 pour insérer la deuxième fusion *xfp::parBpMT1*. Cependant, nous avons décidé de laisser la construction *xfp::parBpMT1* avec un fluorophore (mCherry) sur un plasmide dérivé du pLN135. Dans la souche MS112, le gène *lacI* est sauvage et régule l'opéron *lacZYA*. J'ai choisi d'insérer par intégration / excision la fusion *gfp::parBP1* à ce *locus* (pMS8). J'ai remplacé la fusion *gfp::parBP1* sur le pMS8 par une fusion *mCherry::parBpMT1*, la mCherry provenant du pROD17 (Laboratoire de D.Sherratt) et le *parBpMT1* du pFHC2973, le linker entre les deux étant le même que pour la fusion *gfp::parBP1*. Ce plasmide, nommé pMS11, dispose d'une région d'homologie au gène *lacI* sauvage (les 282 premiers nucléotides ne sont pas présents dans la séquence d'homologie) et la région promotrice avec les opérateurs *lacO* sauvages. De ce fait, les protéines LacI chromosomiques sont, en présence du pMS11 dans une souche dérivée de MS112, titrés sur les opérateurs.

Le *locus lacZ* de la souche MS112 ne nécessite pas la présence d'IPTG pour visualiser un *locus* marqué par le *parSP1* en présence du pMS11. Dans ces conditions un *locus* avec le *parSpMT1* peut être visualisé en microscopie à fluorescence (Figure 32B).

Le choix de l'insertion du système P1 sur le chromosome et non du système pMT1 a été décidé suite aux premières analyses effectuées dans la partie préliminaire à la thèse. En effet, nous avons remarqué que l'ajout de quantités croissantes en IPTG dans une souche

avec un *locus* marqué *parSP1* et avec le plasmide pALA2705 (*gfp::parB-PI*) change peu le pourcentage de cellules avec un *focus*, puisque l'effet de sur-cohésion est déjà très intense. Pour le même *locus* marqué cette fois avec le système ParB/*parSpMT1*, l'induction à l'IPTG augmente progressivement ce pourcentage après induction en présence d'IPTG. Ces résultats suggèrent que certaines propriétés intrinsèques au système ParB/*parSP1* (et différentes du système ParB/*parSpMT1*) sont responsables de l'effet sur-cohésif induit par ce système. Placer ce système sur le chromosome nous a permis de compenser cette sur-cohésion pour contrôler efficacement l'expression de ce système. Dans ces conditions, les deux systèmes donnent les mêmes résultats pour un même *locus* marqué.

Il se peut que le système ParB/*parSpMT1* modifie lui aussi la cohésion du *locus* marqué. Les premières analyses d'avant thèse n'ont comparées que le système ParB/*parSP1* avec le système ParB/*parSpMT1*. Nous avons décidé d'utiliser le système FROS (*tetO/TetR*) en contrôle du système ParB/*parSpMT1*. Le système *tetO/TetR* n'induit pas de cohésion supplémentaire au *locus* marqué. Il a été utilisé dans la souche de référence du laboratoire pour plusieurs *loci*. Une construction *tetR::gfp* sous le contrôle du promoteur arabinose a été transduite d'une souche de l'équipe de Jean-Yves Bouet dans la souche référence de notre laboratoire. Des répétitions *tetO* ont été clonées dans un dérivé du pLN135 avec les homologies aux *loci* d'intérêts. Différentes longueurs de répétitions *tetO* ont été testées, mais étant donné, la propriété de ces séquences à recombiner entre elles et à être instables, seule une longueur conséquente de répétition *tetO* a été insérée (pFX241) par intégration / excision aux *loci* d'intérêts. Une induction d'au moins une heure avec 0.2 % d'arabinose est nécessaire avant d'observer les souches en microscopie. Les résultats présentés **Figure 1C (Stouf 2013)**, montrent que le système ParB/*parSpMT1* n'induit pas une cohésion supplémentaire en comparaison avec le système *tetO/TetR* pour un même *locus* marqué.

2.2-Analyse des paramètres du cycle cellulaire.

En condition rapide de croissance (M9 Glycérol CSA, 30°C), un certain nombre de cellules avec trois *foci* pour un *locus* marqué dans la région Terminale, sont présentes. Cette catégorie de cellules indique la présence de plus de deux copies du chromosome et donc la présence de cycles répliatifs chevauchants. Nous avons alors décidé de changer la nature du milieu et de paramétrer les différentes étapes du cycle cellulaire dans nos conditions de croissance. Changer la nature du milieu pour ralentir le cycle de croissance nous permet de n'avoir au maximum que deux copies d'un même *locus* au cours du cycle cellulaire. Au-delà

de deux *foci* observés pour un *locus* marqué, le classement des cellules en catégories dépendantes du nombre de *foci*, rend difficile l'analyse et la compréhension des données. En effet, des cellules avec au moins trois *foci* représentent des cellules avec trois à six copies d'un même *locus* : la limite de résolution du microscope utilisé est de 200 nm ce qui ne permet pas de séparer physiquement des *loci* répliqués et en cohésion, avec des *loci* qui n'ont pas été répliqués. Il est alors difficile de déterminer lesquels sont répliqués / ségrégés. Dans des conditions de croissance où il n'y a pas de cycles chevauchants, l'apparition d'une catégorie de cellules de plus de deux *foci* pour un *locus* chromosomique marqué permet de caractériser phénotypiquement certains mutants.

Nous avons décidé de travailler en présence d'alanine comme source carbonée. L'alanine est une source carbonée pauvre, mais suffisante pour la croissance de la souche MS112 et ses dérivées. Le milieu a été supplémenté en thymine et leucine et sans CSA à 30°C. Dans ces conditions, le temps de génération est de 210 minutes. L'analyse du cycle cellulaire a été effectuée dans un premier temps au sein de l'équipe par la transduction d'une fusion SSB-Yfp dans les souches avec des *parS* et répétition *tetO* pour mesurer la durée de la période C (réplicative) en « Time-Lapse ». Seulement, la donnée de la période réplicative (période C) ainsi que le temps de génération déterminé par suivi de DO ne permettent pas de déterminer tous les paramètres du cycle cellulaire (périodes B et D).

Afin de connaître ces autres périodes, nous nous devions d'analyser les données précisément. Or, nous ne disposions pas de cytomètre au laboratoire. Je suis donc parti un mois et demi au sein de l'équipe de David Sherratt à Oxford pour utiliser leurs compétences en cytométrie et mesurer les différentes périodes de mon cycle cellulaire. Les résultats sont décrits en **Figure S1 (Stouf 2013)**. Chacune des souches testées en cytométrie a été analysée en phase exponentielle de croissance avec et sans céphalexine et rifampicine (pour bloquer l'initiation de la réplication et la division, **Figure 9**) ainsi qu'en phase stationnaire de croissance. Au cours de mes analyses, j'ai remarqué que l'ajout d'anhydrotetracycline change drastiquement les paramètres de mon cycle : j'ai décidé par la suite de ne pas en utiliser en présence de répétition *tetO* en conditions lente de croissance.

2.3-Publication

FtsK actively segregates sister chromosomes in *Escherichia coli*

Mathieu Stouf^{a,b}, Jean-Christophe Meile^{a,b}, and François Cornet^{a,b,1}

^aLaboratoire de Microbiologie et de Génétique Moléculaires, Centre National de la Recherche Scientifique, F-31000, Toulouse, France; and ^bUniversité Paul Sabatier, Université de Toulouse, F-31000, Toulouse, France

Edited by Nancy E. Kleckner, Harvard University, Cambridge, MA, and approved May 23, 2013 (received for review March 6, 2013)

Bacteria use the replication origin-to-terminus polarity of their circular chromosomes to control DNA transactions during the cell cycle. Segregation starts by active migration of the region of origin followed by progressive movement of the rest of the chromosomes. The last steps of segregation have been studied extensively in the case of dimeric sister chromosomes and when chromosome organization is impaired by mutations. In these special cases, the divisome-associated DNA translocase FtsK is required. FtsK pumps chromosomes toward the *dif* chromosome dimer resolution site using polarity of the FtsK-orienting polar sequence (KOPS) DNA motifs. Assays based on monitoring *dif* recombination have suggested that FtsK acts only in these special cases and does not act on monomeric chromosomes. Using a two-color system to visualize pairs of chromosome loci in living cells, we show that the spatial resolution of sister loci is accurately ordered from the point of origin to the *dif* site. Furthermore, ordered segregation in a region ~200 kb long surrounding *dif* depended on the oriented translocation activity of FtsK but not on the formation of dimers or their resolution. FtsK-mediated segregation required the MatP protein, which delays segregation of the *dif*-surrounding region until cell division. We conclude that FtsK segregates the terminus region of sister chromosomes whether they are monomeric or dimeric and does so in an accurate and ordered manner. Our data are consistent with a model in which FtsK acts to release the MatP-mediated cohesion and/or interaction with the division apparatus of the terminus region in a KOPS-oriented manner.

The faithful transmission of bacterial genomes to daughter cells is a progressive process. Both replication and segregation of circular chromosomes proceed from a single origin of replication to the opposite terminus (1–3). This process defines two origin to terminus (*ori-ter*) replicohores of opposite polarity, also characterized by sequence composition and biases in DNA motifs (4). Segregation of the *Escherichia coli* chromosome has been investigated using FISH and fluorescent DNA-binding proteins (5–8). In slowly growing newborn cells, the *ori* region localizes at midcell and the *ter* region close to the new cell pole. Replicated *ori* regions migrate to the quarter positions (the center of the future daughter cells) by an uncharacterized active mechanism and are followed by the rest of the chromosome in the *ori*-to-*ter* order. *Ter* loci migrate to midcell where they are replicated. This movement occurs near the cell periphery (9) and during *ter* replication (10), suggesting that replication may pull *ter* to midcell. Replication of *ter* is concomitant with the recruitment at midcell of the early components of the cell division apparatus [the divisome (6)]. The *ter* region then is maintained at midcell during the postreplicative period. This localization depends on the MatP protein that binds *matS* sites scattered in a 780-kb region referred to as the “Ter macrodomain” (11). MatP binding to *matS* compacts this region and delays its segregation. This latter effect depends on the interaction of MatP with ZapB, an early component of the divisome (10).

Segregation of the *ter* region has been studied extensively in the special case of dimeric sister chromosomes that arise by recombination during replication (12). In this case, XerCD-mediated recombination at the *dif* site, located in the *ter* region, is required to resolve chromosome dimers. FtsK, a DNA translocase associated

with the divisome, is also required (13, 14). FtsK acts in a region about 400 kb long (15) and translocates DNA toward *dif*. Translocation is oriented by recognition of the FtsK-orienting polar sequences (KOPS) DNA motifs that are preferentially oriented toward *dif*, particularly in the *ter* region (4, 16–18). Upon reaching the *dif* site, FtsK activates XerCD-mediated recombination that resolves chromosome dimers. The oriented translocation activity of FtsK also is strictly required when chromosome organization is impaired by mutations, for instance by inactivation of the MukBEF complex (19, 20) or in strains carrying important asymmetry of the replicohores (21).

Although it is generally agreed that there is an active mechanism for segregation of the *ori* region, active segregation of other chromosome regions has not been reported. Indeed, models inferred from genetics analyses posit that FtsK acts only during special segregation events (19, 20, 22). Here, we show that FtsK segregates the *ter* region in most, if not all, cells. We analyzed the relative segregation times of sister chromosome loci using fluorescence microscopy and showed that it follows a precisely ordered pattern ending at the *dif* site. Ordered segregation of a large region (at least 200 kb) surrounding the *dif* site did not depend on the presence of chromosome dimers but depended on both FtsK and the MatP protein.

Results

Improving Loci Visualization Systems. To visualize chromosome loci, we used previously described systems (6, 23). We inserted *parS* sites from plasmids P1 and pST1 (*parS_{P1}* and *parS_{pMT1}*, respectively) or an array of *tet* operators (*tetO*) at a set of chromosome loci (Tables S1–S3). Strains carrying these constructs were observed in slow-growing conditions to facilitate the observation of segregation events at nearby loci (Material and Methods). In these conditions, our reference strain grew with a 210-min doubling time with no overlapping replication cycle and an extended postreplicative period (Fig. S1).

ParB_{P1} and TetR-derived fluorescent protein were produced from constructs inserted at the *lac* and *ara* chromosome loci, respectively, and the ParB_{pMT1}-derived protein from the low copy number plasmid pMS11 (Fig. 1A and Tables S1–S3). Fluorescent foci were readily detected without inducer using pMS11, but a moderate concentration of reducers was required using the chromosome-borne constructs (Fig. 1B). Most interestingly, the two ParB-derived systems yielded equivalent numbers of foci per cell, slightly more than the TetR-derived system (Fig. 1C). This result contrasted with previously described systems for the production of ParB derivatives (23, 24). In our strains, XFP-ParB_{P1} proteins produced from previously described plasmids

Author contributions: M.S., J.-C.M., and F.C. designed research; M.S. performed research; M.S. and F.C. analyzed data; and F.C. wrote the paper.

The authors declare no conflict of interest.

This article is a PNAS Direct Submission.

¹To whom correspondence should be addressed. E-mail: cornet@ibcg.biotoul.fr.

This article contains supporting information online at www.pnas.org/lookup/suppl/doi:10.1073/pnas.1304080110/-/DCSupplemental.

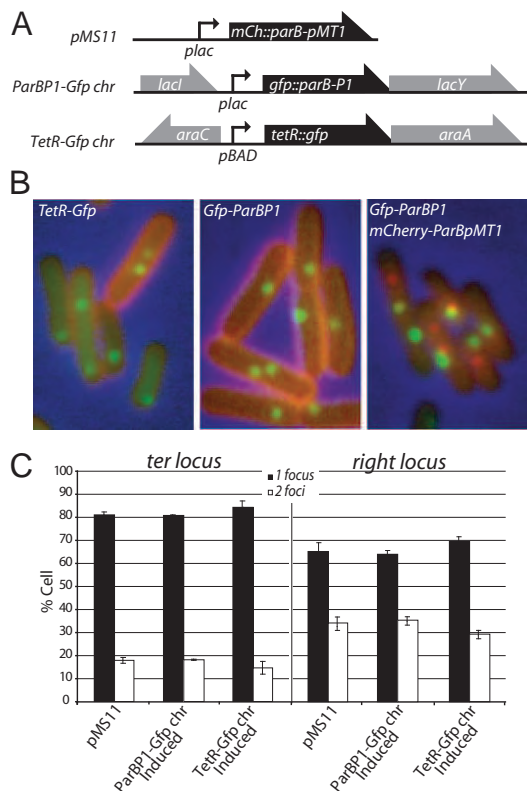


Fig. 1. Systems used for visualization of chromosome loci. (A) Relevant map of constructs for fluorescent protein production. Plasmid pMS11 is a pSC101 derivative carrying a *lacZp-mCherry-Δ30ParB_{P1}* construct. GFP- Δ 23ParB_{pMT1} and TetR-GFP were produced from chromosome-borne constructs at the *lac* and *ara* loci, respectively. (B) Examples of micrographs showing foci of the indicated fluorescent proteins in strains containing loci tagged with the relevant binding sites (*ydjL::tetO* or *parS_{P1}*; *ycdC::parS_{P1}*, and *ydeU::parS_{pMT1}*). (C) The percentage of cells with a single focus or two foci of the *ydjL* (*ter*) or *ydhJ* (*right*) loci when visualized using fluorescent proteins produced from constructs shown in A.

provoked a significant delay in loci segregation, even when no inducer was added (Fig. S2B). This effect was significantly enhanced in faster-growing cells (Fig. S2C).

We next observed the effects of localization systems on the cell cycle by measuring the number of replication origins per cell using flow cytometry (Fig. S3). The ParB_{pMT1} system using plasmid pMS11 did not modify this ratio compared with the wild-type strain. The two other systems provoked the appearance of cells with four replication origins, indicating that cell division was delayed in some cells, undoubtedly because of replication and/or segregation defects. These effects were most pronounced with the TerR system, whereas the ParB_{P1} system provoked less than 10% four-foci cells at any locus. We thus used the two ParB-derived systems for the simultaneous localization of two loci.

The Chromosome Segregation Pattern Is Highly Accurate. Although the *ori*-to-*ter* segregation pattern is well established, it is unclear whether this pattern pertains to all cells or if it is subject to important cell-to-cell variation. To measure cell-to-cell variation, we compared the segregation of a locus close to the *dif* site (*ydeU*, 2 kb clockwise from *dif*) with that of other loci. To minimize the risk of artificial segregation delay at the *ydeU* locus, we used the ParB_{pMT1} system to localize it and the ParB_{P1} system to localize the other loci: an *oriC*-proximal locus (*ilvA*); two midreplicore loci (*yffS* and *ybhJ*), and a *ter* locus (*ycgY*, 345 kb from *dif*). When the two systems were used in the same cells, both loci were readily detected without the addition of an inducer because of the

titration of the LacI repressor by pMS11-borne *lacZp* (Fig. 1B). Less than 1.5% cells lacked foci of either visualization system. Cells were classed into categories according to their number of foci at each locus. In cells with two foci, the ratio of the interfocal distance to cell size did not increase with the cell size (Fig. S4). The spatial resolution of sister foci thus is followed quickly by their rapid displacement to opposite halves of the cell so that this movement is not detected in snapshot analysis. This result indicates that the time when sister loci lose their colocalization reflects the kinetics of the whole segregation process in our analysis. As expected, the ratio of cells with one focus for each locus increased with decreasing distance from *ydeU* (Fig. 2, open bars), and the ratio of cells with two foci at each locus was constant because it depended on *ydeU* segregation (gray bars). Loci thus segregated in their order of replication. The mean times of postreplicative colocalization, calculated from the inferred replication and measured segregation mean times (see Fig. S1 and legend), ranged from 35 min for *ybhJ* and *ycgY* to 50 min for *ilvA*.

Cells with three foci (two foci at one locus and one focus at the other) would fall in two classes depending on which focus was duplicated (Fig. 2). The proportion of cells with two ParB_{P1} foci and one ParB_{pMT1} focus decreased with the distance from *ydeU* (green bars), consistent with decreasing time between the segregation of the two loci. Strikingly, less than 1% of cells with three foci had duplicated *ydeU* foci (red bars). Thus the *ydeU* locus is almost always segregated later than the other loci, including the *ycgY* locus located in the *ter* region. The segregation pattern of the chromosome thus is highly accurate, the *ter* region being the last segregated in almost all cells. These data also pointed out that segregation of the *ter* region occurs in an ordered sequence, the *ydeU* locus, closest to *dif*, being segregated later than *ycgY*, which is more remote from *dif*. This result prompted us to analyze *ter* segregation in more detail.

Chromosome Segregation Ends at *dif*. To obtain a detailed view of *ter* segregation, we constructed insertions of *parS* sites and *tetO* arrays at additional *ter* loci (Fig. 3A). We first analyzed the positioning of single loci depending on cell size (Fig. 3B and Fig. S4).

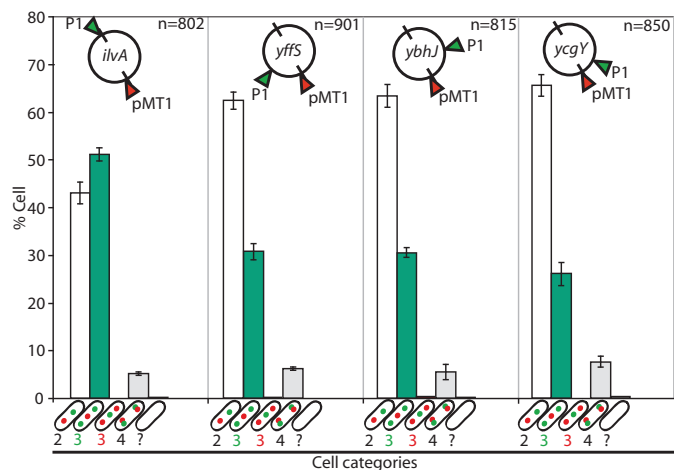


Fig. 2. The *ori*-to-*ter* segregation of the chromosome. The *ydeU* locus was tagged using the ParB_{pMT1} system (red arrowhead), and other loci, indicated inside the chromosome maps, were tagged with the ParB_{P1} system (green arrowheads). Positions of loci on the chromosome are indicated by lines representing *ori* (top) and *dif* (bottom). The number of cells analyzed is given (*n*). Cells were classified by the number of foci of each locus (shown in cartoons on the x-axis; the empty cell indicates cells that fall in none of the first four categories). Bars show the mean percentage of each category in the population (y-axis) with individual measured ranges. Data reflect at least two independent experiments.

All loci tended to localize close to a cell pole in smaller cells and then migrate to midcell before foci duplication (Fig. 3C). Loci closer to the *dif* site tended to segregate later, as shown by their lower foci number per cell. We also noticed that loci closer to the *dif* site tended to stay closer to each other after segregation, as shown by the lower average interfocal distance in cells with two foci (Fig. 3C). We then compared the *ycgY* and *ydgJ* loci (342 and 114 kb from *dif*, respectively) in more detail. We introduced an *ssb-mCherry* fusion gene in strains tagged at these loci. Cells longer than 3 μm and harboring no SSB-mCherry focus were considered to be in their D period (see also Fig. S1). These cells were categorized into two classes, depending on whether or not they harbored a midcell constriction (38 and 62%, respectively). Segregation of *ydgJ* was clearly delayed compared with that of *ycgY* in all cell categories (Fig. 3D). From these data, we inferred that the mean segregation time of *ydgJ* is 35 min before cell separation, concomitant with the onset of constriction, whereas *ycgY* segregates about 10 min earlier (see Fig. S1 for calculations).

We next constructed strains with chosen pairs of loci tagged with *parS_{PI}* and *parS_{PMT1}* sites. The localization systems were swapped between loci to detect any system-induced artifact. Fig. 3D shows the segregation of the *ydeU* locus compared with *ydcB* and *ydgJ* (100 kb counterclockwise and 100 kb clockwise from *dif*, respectively). As expected, all three loci segregated late; hence most cells had one focus at each locus. Between 7 and 10% of the cells had three foci. Among these, less than 6% had duplicated *ydeU* foci, whereas more than 94% had duplicated *ydcB* or *ydgJ* foci. We concluded that the *ydeU* locus segregates later than the *ydcB* and *ydgJ* loci in the vast majority of cells. Equivalent results were

obtained when comparing segregation of the *ydeP* locus (3 kb counterclockwise from *dif*) with that of *ydcB* and *ydgJ* (Fig. S5 A–D): *ydeP* segregated later than the two other loci in most cells. In all cases, swapping the localization systems between loci modified neither their timing nor their order of segregation (Fig. 3D and Fig. S5 A–D).

Consistent with an *ori*-to-*dif* pattern of segregation, the *arpB* locus (214 kb from *dif*) segregated earlier than the *dif* site (*ydeU*) and than the *ydgJ* locus, located closer to *dif* on the same side (Fig. S5 E and F). However, no segregation order was observed between loci located on opposite sides of *dif* (Fig. S5 G and H). These data show that the whole chromosome, including the *dif*-proximal part of the *ter* region, segregates in an accurately ordered manner, the *dif* site being the very last to be segregated in the great majority of cells.

Monomeric Chromosomes Are Segregated Orderly. The orderly segregation of the *dif* region is unlikely to be restricted to dimeric chromosomes; otherwise the loci in this region would have to segregate simultaneously in monomeric chromosomes, thus minimizing the number of three-foci cells with two foci of *dif*-proximal loci. To reject this hypothesis unambiguously, we inactivated RecA in cells carrying pairs of tagged loci, thereby preventing dimer formation (25, 26). RecA inactivation resulted in the appearance of about 3% dead cells (blue bars in Fig. 4 and Fig. S6H). Most living cells were of normal size and had two to four foci. The order of segregation between *dif*-proximal loci (*ydeU* and *ydeP*) and loci located about 100 kb (*ydcB* and *ydgJ*) or further away from *dif* (*ycgY*) was conserved compared with wild-type strains (green

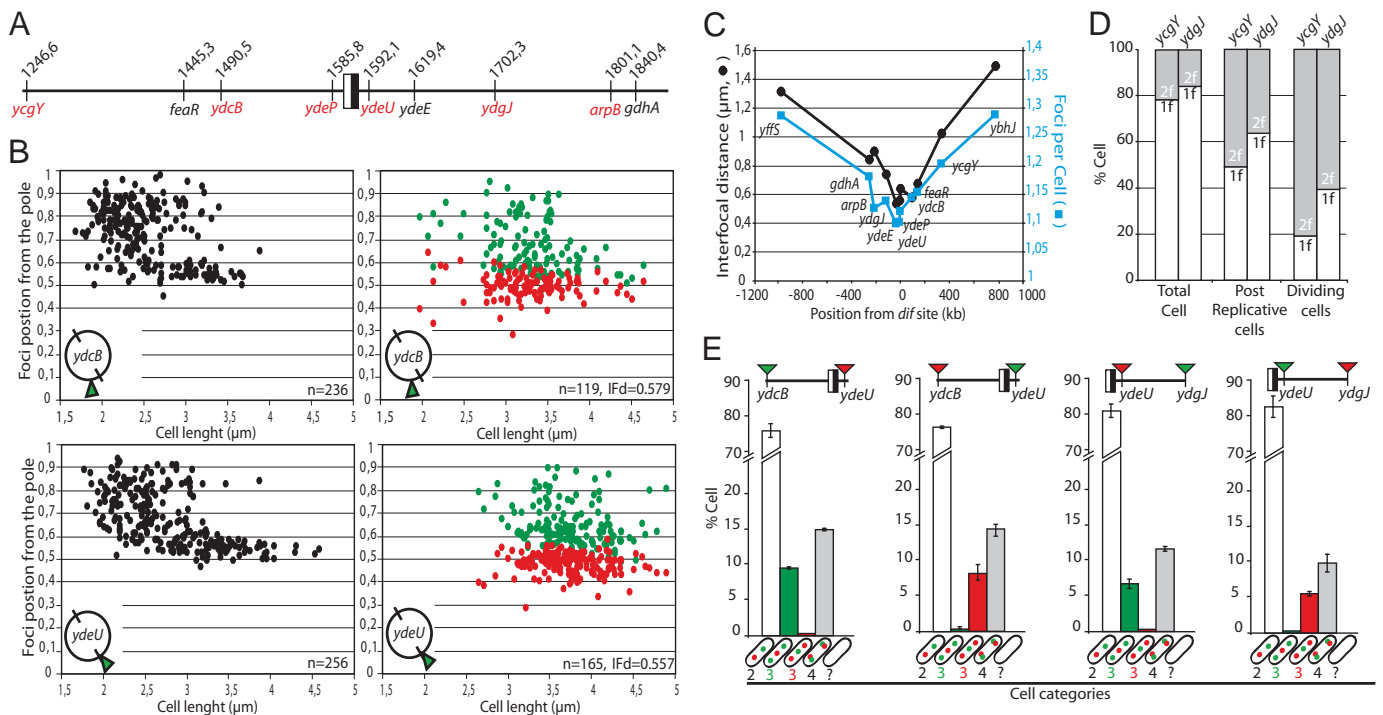


Fig. 3. *ter* segregation is sequential and ends at *dif*. (A) Map of the loci used, with coordinates indicated. The black and white box represents the *dif* site. Red loci were tagged with both ParB-derived systems, black loci were tagged with the TetR-derived system, and the *ydgJ* and *ycgY* loci were tagged with all three systems. (B) Intracellular position of foci tagged with *parS_{PI}* and *parS_{PMT1}* from their farthest pole (x-axis) as a function of cell length (y-axis). (Left) Cells with a single focus (black dots). (Right) Cells with two foci (red and green dots). Loci are indicated, as well as the number of cells analyzed and the mean interfocal distance (IFd). (C) Plot of the interfocal distance in cells with two foci (black curve and dots, left axis) and the mean number of foci per cell (blue curve and squares, right axis) as a function of the distance from *dif* (kb, x-axis). (D) Number of foci of the indicated loci in different cell categories. Strains carried an SSB-mCherry fusion. Postreplicative cells are >3 μm long and harbor no SSB focus and no constricting septum. Dividing cells have a constricting septum. (E) Tagged loci are indicated with their position relative to *dif*. Red arrowheads indicate a *parS_{PMT1}* tag, and green arrowheads indicate a *parS_{PI}* tag. Cells were classified by the number of foci of each locus (shown in cartoons on the x-axis; the empty cell indicate cells that fall in none of the first four categories). Bars show the mean percentage of each category in the population (y-axis) with individual measured ranges. Data reflect at least two independent experiments and more than 600 cells.

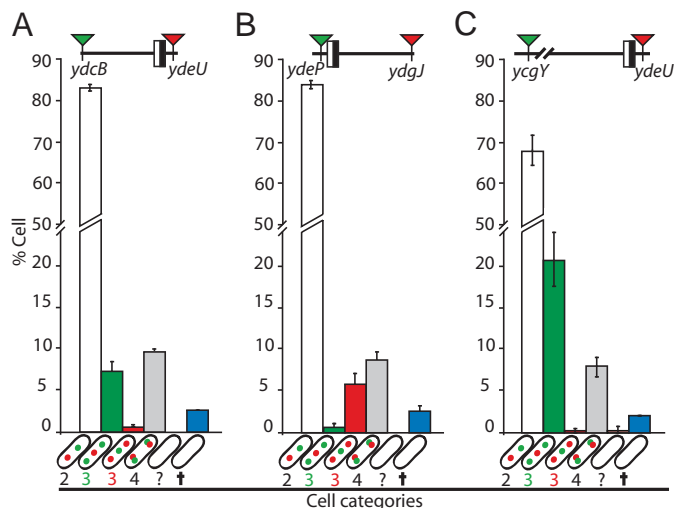


Fig. 4. Segregation of *ter* in *recA*⁻ strains. (A–C) Tagged loci are indicated in their position relative to *dif* (the black and white box). Red arrowheads indicate a *parS*_{PMT1} tag, and green arrowheads indicate a *parS*_{P1} tag. Cells were classified by the number of foci of each locus (shown in cartoons on the x-axis; the empty cell indicates cells that fall in none of the first four categories; blue bars indicate dead cells, see also Fig. S6). Bars show the mean percentage of each category in the population (y-axis) with individual measured ranges. Data reflect at least two independent experiments and 600 cells.

and red bars in Fig. 4; compare Fig. 4 with Figs. 2 and 3D and Fig. S5B). This result shows that ordered segregation is not restricted to chromosome dimers.

We then asked if the XerCD/*dif* complex is required for ordered segregation. As expected, inactivation of XerC resulted in the appearance of 10–15% dead cells and cells of abnormal shape (blue bars in Fig. S6 C and D). We then inactivated RecA in *xerC*⁻ strains, thereby lowering the number of abnormal cells to few percent of the population (Fig. S6 E and F). In both *xerC*⁻ and *xerC*⁻*recA*⁻ strains, the order of segregation of the *dif* region was conserved in normal cells as compared with wild-type strains (Fig. S6 C–F). We conclude that the XerCD/*dif* system is not required for orderly segregation of the *dif* region.

FtsK Segregates the *dif*-Surrounding Region. FtsK is an obvious candidate to play a direct role in an ordered segregation process ending at the *dif* site because it translocates chromosomal DNA toward *dif* using polarization of the KOPS motifs. We thus attempted to analyze *ter* segregation in *ftsK* mutants. We first inactivated translocation using the *ftsK*_{ATP} and Δ (*ftsK*_C) alleles. Both mutations resulted in the appearance of 15–20% dead cells reflecting inactivation of chromosome dimer resolution (Fig. 5 A

and B and Fig. S6 A and B). In addition, 50–60% of living cells were classified as abnormal (salmon bars in Fig. 5 and Fig. S6). These include cells of abnormal shape or length or that showed no fluorescent signal or an abnormal number of foci. These effects may be partially linked to a role of the translocase domain of FtsK in the control of cell division (21). It renders the analysis of foci number per cell in normal cells hazardous, because we cannot determine if it impoverished some cell categories more than others. Nevertheless, we noticed that ordered segregation of the *dif* region seemed to be lost because of the inactivation of translocation (red and blue bars in Fig. 5 A and B and Fig. S6 A and B). We then used the *ftsK*_{KOPSblind} mutant, which shows a milder phenotype than translocation-deficient mutants and supports resolution of the largest part of chromosome dimers (20). The FtsK_{KOPSblind} protein activates XerCD/*dif* recombination but translocates in a nonoriented manner in vivo and in vitro because of its defect in KOPS recognition (20, 27). As expected, *ftsK*_{KOPSblind} strains showed very few abnormal or dead cells. The ratio of cells with duplicated foci of *ter* loci tended to decrease, suggesting that they segregated later because of the *ftsK*_{KOPSblind} mutation (compare Fig. 5 and Fig. 3E). Strikingly, the order of the segregation of the *ydcB* and *ydgJ* loci compared with the *dif* site (*ydeU* and *ydeP*) was lost or was significantly altered as compared with wild-type strains (red and green bars in Fig. 5 A–D; compare with Fig. 3E and Fig. S5). However, the order of segregation between *ycgY*, which is outside the region of high FtsK activity (15), and the *dif* site (*ydeU*) was unaffected by the *ftsK*_{KOPSblind} mutation (Fig. 5E). We conclude that the KOPS-oriented translocation activity of FtsK is required for the ordered segregation of a large (at least 210 kb) but restricted region around *dif*.

MatP Controls *ter* Segregation. Because MatP delays *ter* segregation, we reasoned that its activity might be required for FtsK-dependent ordered segregation of *ter*. We inactivated MatP in cells carrying pairs of tagged loci and monitored their number of foci per cell. A small number of cells longer than wild-type cells and harboring more than four foci appeared in *matP*⁻ strains, consistent with a mild defect in cell division caused by MatP inactivation (11). Among cells of normal size, the ratio of cells with four foci (i.e., with both loci segregated) increased in *matP*⁻ strains compared with wild type (compare gray bars in Fig. 5 A and B with Fig. 3D), consistent with earlier segregation of *ter* loci as previously observed (11). Cells with three foci (red and green bars in Fig. 5 A and B) were underrepresented because of *matP* inactivation, indicating that the mean time separating segregation of the two loci (i.e., *ydcB* and *ydeU*) was shorter. Among these cells, no consistent order of segregation was detected between the *ydcB* and *ydgJ* foci and the *dif* site (*ydeU* and *ydeP*) (Fig. 5 A and B). The order of segregation in the *dif*-surrounding region thus was lost with MatP inactivation, showing that MatP is required for the ordered

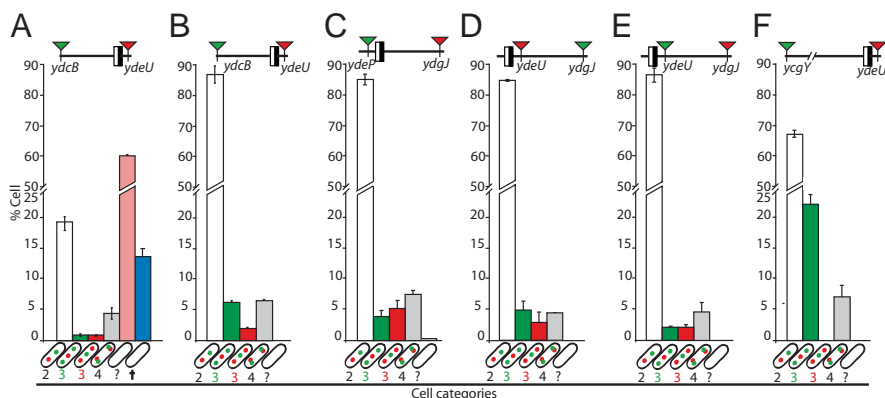


Fig. 5. Segregation of *ter* in *ftsK* mutant strains. Tagged loci are indicated in their position relative to *dif* (the black and white box). Red arrowheads indicate a *parS*_{PMT1} tag, and green arrowheads indicate a *parS*_{P1} tag. (A) *ftsK*_{ATP} strain. (B–F) *ftsK*_{KOPSblind} strains. Cells were classified by the number of foci of each locus (shown in cartoons on the x-axis; the empty cell indicates cells that fall in none of the first four categories; blue bars indicate dead cells; see also Fig. S6). Bars show the mean percentage of each category in the population (y-axis) with individual measured ranges. Data reflect at least two independent experiments and 600 cells.

segregation of this region. Interestingly, a preferred order of segregation still was apparent between the *ycgY* locus and *dif*, although it was less pronounced than in wild-type cells (compare Fig. 5C and Fig. 2). The *ycgY* locus lies in the region covered by *matS* sites but not in the region processed by FtsK (see above). This result strongly suggests that MatP is required for ordered segregation only in the region processed by FtsK.

Discussion

We have established the pattern of the loss of colocalization of sister loci, a crucial step of segregation, of the *ter* chromosomal region in slow-growing *E. coli* cells. This investigation relied on an improved version of previously described loci visualization systems derived from the Par systems of plasmids P1 and pMT1. We produced the ParB_{P1}-derived protein from a chromosome-borne construct and the ParB_{pMT1}-derived protein from a low copy number plasmid, reasoning that this derivation should minimize both their background production and cell-to-cell variation. Indeed, the two ParB-derived systems and a TetR-derived system gave equivalent results when used to visualize the same loci, rendering these systems suitable for direct comparison of loci segregation patterns. In contrast, the use of previously described plasmids for production of ParB_{P1}-derived proteins provoked delays in the segregation of the tagged loci. This effect varied with both growth conditions and the positions of the tagged loci on the chromosome and was significant in conditions used in previous studies, including ours (5, 8, 10, 11, 21, 24, 28). Previous reports of chromosome loci segregation using ParB-derived systems thus should be considered with care.

The *ori*-to-*ter* segregation pattern of the chromosome is highly accurate. Less than 1% cells segregated a *ter* locus before loci located outside *ter* (Fig. 2). Most interestingly, segregation of the *dif*-surrounding region also is precisely ordered. Indeed, the *dif* site is segregated later than loci 100 kb apart in more than 94% of the cells (Fig. 3); thus the whole chromosome segregates from the *ori* region to the *dif* site. This strict order of segregation strongly suggests that it occurs in most, if not all, cells and is not restricted to chromosome dimers. Indeed, if the order of segregation were restricted to chromosome dimers, then the loci in the *ter* region would have to segregate simultaneously in monomeric chromosomes, thus minimizing the number of three foci cells with two foci of *dif*-proximal loci, an effect that seems most unlikely. In addition, neither the XerCD/*dif* system, which resolves dimers, nor RecA, which is strictly required for dimers, is required for ordered segregation of the *dif* region (Fig. 4 and Fig. S6), showing unambiguously that monomers are segregated in an ordered manner.

Segregation of the *dif*-surrounding region occurs during the late stages of the cell cycle. For instance, loci from *ydjI* to *ydbL* have a mean number of foci per cell less than 1.15, indicating that they segregate in the last 40 min of the cell cycle (Fig. 3 and Fig. S1). At this stage, cells have terminated replication and are about to divide or are dividing. Divisome components, including FtsK, thus are assembled at midcell, (6). A role for FtsK in the ordered segregation of this region thus is consistent with the timing of its segregation. We verified this hypothesis using different FtsK mutants, including an allele deficient for KOPS recognition, and showing that the order of segregation of the *dif*-surrounding region is lost with these mutations (Fig. 5). This effect is observed in a region covering at least 210 kb (from *ydcB* to *ydjI*) but does not affect the *ycgY* locus, 344 kb from *dif*. This result is fully consistent with the length of the region preferentially processed by FtsK, i.e., the region of high FtsK activity [338–468 kb centered on *dif* (15)]. We previously reported that *ftsK_{KOPSblind}* cells are longer than wild-type cells, suggesting that this mutation delays cell division (20). This delay may modify the timing of the segregation of chromosome loci with respect to cell division and so might indirectly affect the accuracy of their segregation order. Our data argue against such an indirect effect because the *ftsK_{KOPSblind}* mutation does not

change the mean number of foci per cell of *dif*-proximal loci (compare gray bars in Figs. 3 and 5). In addition, the FtsK_{KOPSblind} protein interacts with the same region and at comparable frequencies as FtsK_{wt} when assayed by the frequency of XerCD/*dif* recombination (15). These data indicate that segregation of the *dif*-surrounding region remains temporally linked to cell division in the *ftsK_{KOPSblind}* strain, suggesting that the FtsK_{KOPSblind} protein still segregates this region although in a nonordered manner.

So far, FtsK has been shown to support chromosome segregation only in special conditions, the most frequent and best understood being the formation of chromosome dimers (19–21). Our results reveal that FtsK segregates the *dif*-surrounding region of monomeric chromosomes, although this activity is essential only in the case of dimers. This conclusion may appear contradictory, given the RecA-dependency of XerCD recombination between *dif* sites inserted at the *dif* locus (22). We currently have no explanation for this discrepancy. A specific processing of the *dif* locus on dimers remains possible. Alternatively, RecA may control the XerCD/*dif* recombination independently of the dimeric state of the chromosome. This latter hypothesis is supported by the RecA-dependency of recombination between plasmid-borne *dif* sites (29). A role for FtsK in the segregation of monomers also may contrast with the growth defect of translocation-deficient FtsK mutants, mainly because of their inability to resolve dimers (30). However, these mutations provoke many more cells of abnormal size or shape than seen with Xer inactivation (i.e., see Fig. S6), suggesting that most *ftsK_C* cells harboring chromosome monomers divide abnormally although they have viable progeny. This notion is consistent with FtsK having a role in coupling *ter* segregation with cell division even when chromosomes are monomeric.

Because FtsK is active only shortly before and during septum constriction (31, 32), FtsK-dependent ordered segregation requires that the *dif*-surrounding region be kept in the vicinity of the septum until FtsK is activated. This appears to be the role of MatP. Inactivation of MatP leads to earlier segregation of *ter* loci and loss of the ordered segregation in the *dif*-surrounding region (Fig. 6). MatP thus certainly allows FtsK to process the *dif*-surrounding region either by its intrinsic cohesin activity or by

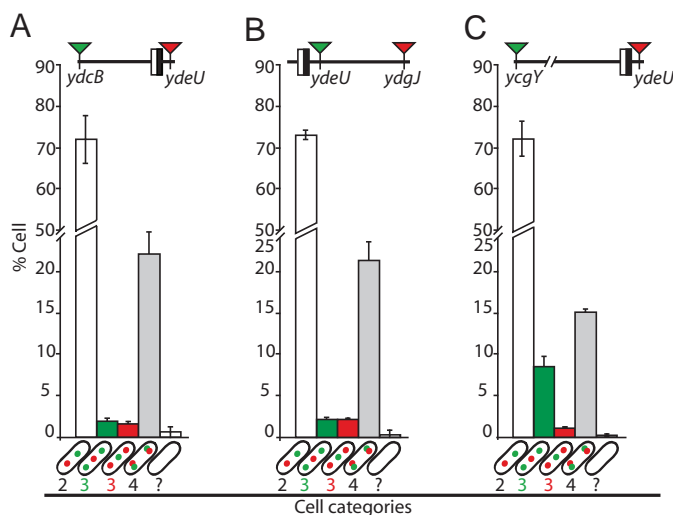


Fig. 6. Segregation of *ter* in *matP*⁻ strains. (A–C) Tagged loci are indicated in their position relative to *dif* (the black and white box). Red arrowheads indicate a *parS_{pMT1}* tag, and green arrowheads indicate a *parS_{P1}* tag. Cells were classified by the number of foci of each locus (shown in cartoons on the x-axis; the empty cell indicates cells that fall in none of the first four categories). Bars show the mean percentage of each category in the population (y-axis) with individual measured ranges. Data reflect at least two independent experiments and 600 cells.

interacting with ZapB (10, 33). Interestingly, the region of high FtsK activity is shorter than the MatP-binding region. We have no explanation for this difference at present. However, we noticed that the density of *matS* sites is most important in a restricted region around *dif* (Fig. S7). This region, which corresponds to region of high FtsK activity in *E. coli*, may be processed by FtsK in most cells because of the density of its *matS* sites, whereas the adjacent regions may show important cell-to-cell variations in FtsK activity.

FtsK has been shown to remove MatP from the DNA during translocation but stops at XerCD/*dif* complexes in vitro (34, 35). We thus assume that FtsK counteracts the effect of MatP by removing it from *matS* sites. In this case, FtsK would act to unzip sister *ter* regions. Whether it then transports DNA to daughter cells remains to be determined. MatP thus would have a role akin to a cohesin and FtsK to a separase, although the mechanisms involved differ significantly from those of eukaryotic cohesins and separases. In wild-type cells, the pattern of ordered segregation implies that MatP removal is sequential. The region of high FtsK activity may be translocated from its borders to *dif* in a processive manner. Alternatively, translocations over short distances may occur randomly but may promote segregation only when they dissociate the MatP/*matS* complexes furthest from *dif*. The rather long time separating segregation of *ter* loci (i.e., more than 5 min for loci 100 kb apart) compared with the speed of FtsK and SpoIIIE translocation in vitro and in vivo [at least 75 kb per min (36, 37)] favor this second hypothesis. In *ftsK_{KOPSblind}* cells, the same process would occur but would last longer because the loss of the sequence of MatP removal delays cell division. In *ftsK_C* cells, MatP would not be removed by FtsK, leading to important defects in cell division. Nevertheless, most cells have viable progeny,

indicating that the *ter* region is finally segregated by other means, possibly involving either passive or active packaging of the mostly segregated sister nucleoids. The co lethality of FtsK_C and MukB inactivation (19, 20) is consistent with this hypothesis.

Materials and Methods

Strains and Plasmids. Strains used were derived from *E. coli* K12 strain LN2666 (W1485 F⁻ *leu thyA thi deoB* or *C supE rpsL* (StR) (38) and are listed in Table S1. Plasmids used are listed in Table S2. Tagged chromosome loci are listed in Table S3.

Cell Imaging. Cells were grown in M9 medium containing alanine as a carbon source (0.2%); thiamine (1 μg/mL), thymine (2 μg/mL), and leucine (2 μg/mL). After 48 h cultures were diluted 250 times in fresh medium and were grown to OD₆₀₀ = 0.2 before being mounted on microscope slides. Arabinose (0.2%) or isopropylthio-β-galactoside (50 μM) were added 45 min before mounting, and FM4-64 membrane dye was added 5 min before mounting. Cells were applied to a 1% agarose slide and placed in the microscope temperature-controlled box at 30 °C for at least 30 min before observation on a Ti-E inverted microscope (Nikon) carrying a 100× oil-immersion lens (N.A. 1.36) and a Hamamatsu ORCA-R2 camera. Images were acquired using NIS Elements AR 3.2 software (Nikon) and were converted for manual analysis with MetaMorph v. 7.0 software (Molecular Devices) using a pencil pad.

ACKNOWLEDGMENTS. We thank J.-Y. Bouet and the members of the team for critical reading and helpful discussions; C. Lesterlin for help with flow cytometry experiments; and J.-Y. Bouet and the National BioResource Project-*E. coli* at the National Institute of Genetics (Japan) for the gift of strains. This work was funded by the Centre National de la Recherche Scientifique, University Paul Sabatier, Agence Nationale de la Recherche contract BLAN-1327-01, the Fonds Européen de Développement Régional Midi-Pyrénées, and the Fondation ARC pour la Recherche sur le Cancer. M.S. was supported by a fellowship from the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche and an European Molecular Biology Organization short-term fellowship.

1. Possoz C, Junier I, Espeli O (2012) Bacterial chromosome segregation. *Front Biosci* 17:1020–1034.
2. Reyes-Lamothe R, Nicolas E, Sherratt DJ (2012) Chromosome replication and segregation in bacteria. *Annu Rev Genet* 46:121–143.
3. Toro E, Shapiro L (2010) Bacterial chromosome organization and segregation. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2(2):a000349.
4. Touzain F, Petit MA, Schbath S, El Karoui M (2011) DNA motifs that sculpt the bacterial chromosome. *Nat Rev Microbiol* 9(1):15–26.
5. Li Y, Youngren B, Sergueev K, Austin S (2003) Segregation of the *Escherichia coli* chromosome terminus. *Mol Microbiol* 50(3):825–834.
6. Wang X, Possoz C, Sherratt DJ (2005) Dancing around the divisome: Asymmetric chromosome segregation in *Escherichia coli*. *Genes Dev* 19(19):2367–2377.
7. Bates D, Kleckner N (2005) Chromosome and replisome dynamics in *E. coli*: Loss of sister cohesion triggers global chromosome movement and mediates chromosome segregation. *Cell* 121(6):899–911.
8. Espeli O, Mercier R, Boccard F (2008) DNA dynamics vary according to macrodomain topography in the *E. coli* chromosome. *Mol Microbiol* 68(6):1418–1427.
9. Meile JC, et al. (2011) The terminal region of the *E. coli* chromosome localises at the periphery of the nucleoid. *BMC Microbiol* 11(1):28.
10. Espeli O, et al. (2012) A MatP-divisome interaction coordinates chromosome segregation with cell division in *E. coli*. *EMBO J* 31(14):3198–3211.
11. Mercier R, et al. (2008) The MatP/*matS* site-specific system organizes the terminus region of the *E. coli* chromosome into a macrodomain. *Cell* 135(3):475–485.
12. Lesterlin C, Barre FX, Cornet F (2004) Genetic recombination and the cell cycle: What we have learned from chromosome dimers. *Mol Microbiol* 54(5):1151–1160.
13. Bigot S, Sivanathan V, Possoz C, Barre FX, Cornet F (2007) FtsK, a literate chromosome segregation machine. *Mol Microbiol* 64(6):1434–1441.
14. Sherratt DJ, Arciszewska LK, Crozat E, Graham JE, Grainge I (2010) The *Escherichia coli* DNA translocase FtsK. *Biochem Soc Trans* 38(2):395–398.
15. Deghorain M, et al. (2011) A defined terminal region of the *E. coli* chromosome shows late segregation and high FtsK activity. *PLoS ONE* 6(7):e22164.
16. Bigot S, et al. (2005) KOPS: DNA motifs that control *E. coli* chromosome segregation by orienting the FtsK translocase. *EMBO J* 24(21):3770–3780.
17. Levy O, et al. (2005) Identification of oligonucleotide sequences that direct the movement of the *Escherichia coli* FtsK translocase. *Proc Natl Acad Sci USA* 102(49):17618–17623.
18. Sivanathan V, et al. (2006) The FtsK gamma domain directs oriented DNA translocation by interacting with KOPS. *Nat Struct Mol Biol* 13(11):965–972.
19. Yu XC, Weihe EK, Margolin V (1998) Role of the C terminus of FtsK in *Escherichia coli* chromosome segregation. *J Bacteriol* 180(23):6424–6428.
20. Sivanathan V, et al. (2009) KOPS-guided DNA translocation by FtsK safeguards *Escherichia coli* chromosome segregation. *Mol Microbiol* 71(4):1031–1042.
21. Lesterlin C, Pages C, Dubarry N, Dasgupta S, Cornet F (2008) Asymmetry of chromosome Replichores renders the DNA translocase activity of FtsK essential for cell division and cell shape maintenance in *Escherichia coli*. *PLoS Genet* 4(12):e1000288.
22. Péralis K, et al. (2001) Interplay between recombination, cell division and chromosome structure during chromosome dimer resolution in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 39(4):904–913.
23. Nielsen HJ, Ottesen JR, Youngren B, Austin SJ, Hansen FG (2006) The *Escherichia coli* chromosome is organized with the left and right chromosome arms in separate cell halves. *Mol Microbiol* 62(2):331–338.
24. Nielsen HJ, Li Y, Youngren B, Hansen FG, Austin S (2006) Progressive segregation of the *Escherichia coli* chromosome. *Mol Microbiol* 61(2):383–393.
25. Steiner WW, Kuempel PL (1998) Cell division is required for resolution of dimer chromosomes at the *dif* locus of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 27(2):257–268.
26. Péralis K, Cornet F, Merlet Y, Delon I, Louarn JM (2000) Functional polarization of the *Escherichia coli* chromosome terminus: The *dif* site acts in chromosome dimer resolution only when located between long stretches of opposite polarity. *Mol Microbiol* 36(1):33–43.
27. Nolvios S, Pages C, Rousseau P, Le Bourgeois P, Cornet F (2010) Are two better than one? Analysis of an FtsK/Xer recombination system that uses a single recombinase. *Nucleic Acids Res* 38(19):6477–6489.
28. Liu X, Wang X, Reyes-Lamothe R, Sherratt D (2010) Replication-directed sister chromosome alignment in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 75(5):1090–1097.
29. Recchia GD, Aroyo M, Wolf D, Blakely G, Sherratt DJ (1999) FtsK-dependent and -independent pathways of Xer site-specific recombination. *EMBO J* 18(20):5724–5734.
30. Capioux H, Lesterlin C, Péralis K, Louarn JM, Cornet F (2002) A dual role for the FtsK protein in *Escherichia coli* chromosome segregation. *EMBO Rep* 3(6):532–536.
31. Steiner W, Liu G, Donachie WD, Kuempel P (1999) The cytoplasmic domain of FtsK protein is required for resolution of chromosome dimers. *Mol Microbiol* 31(2):579–583.
32. Kennedy SP, Chevalier F, Barre FX (2008) Delayed activation of Xer recombination at *dif* by FtsK during septum assembly in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 68(4):1018–1028.
33. Dupaigne P, et al. (2012) Molecular basis for a protein-mediated DNA-bridging mechanism that functions in condensation of the *E. coli* chromosome. *Mol Cell* 48(4):560–571.
34. Graham JE, Sivanathan V, Sherratt DJ, Arciszewska LK (2010) FtsK translocation on DNA stops at XerCD-*dif*. *Nucleic Acids Res* 38(1):72–81.
35. Bonnè L, Bigot S, Chevalier F, Allemand JF, Barre FX (2009) Asymmetric DNA requirements in Xer recombination activation by FtsK. *Nucleic Acids Res* 37(7):2371–2380.
36. Saleh OA, Péralis C, Barre FX, Allemand JF (2004) Fast, DNA-sequence independent translocation by FtsK in a single-molecule experiment. *EMBO J* 23(12):2430–2439.
37. Burton BM, Marquis KA, Sullivan NL, Rapoport TA, Rudner DZ (2007) The ATPase SpoIIIE transports DNA across fused septal membranes during sporulation in *Bacillus subtilis*. *Cell* 131(7):1301–1312.
38. Cornet F, Mortier I, Patte J, Louarn JM (1994) Plasmid pSC101 harbors a recombination site, *psi*, which is able to resolve plasmid multimers and to substitute for the analogous chromosomal *Escherichia coli* site *dif*. *J Bacteriol* 176(11):3188–3195.

Supporting Information

Stouf et al. 10.1073/pnas.1304080110

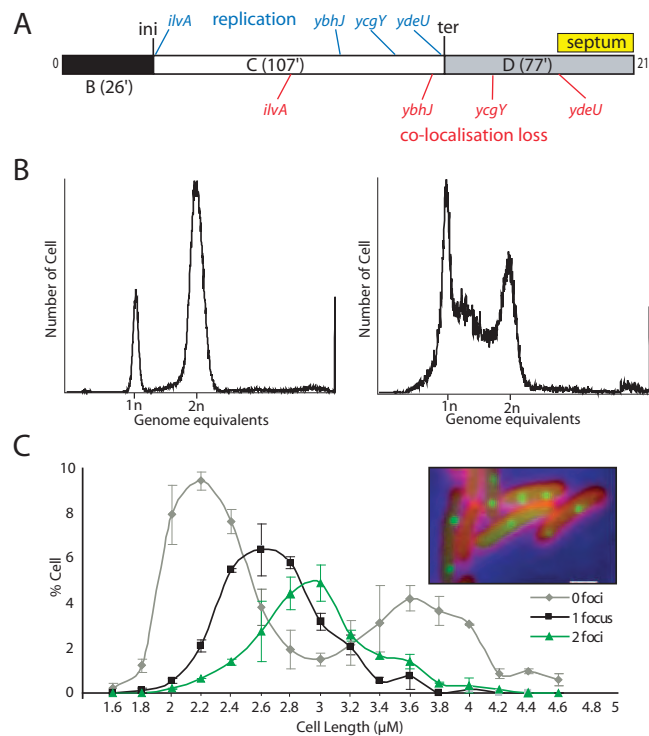


Fig. S1. Cell cycle of strain LN2666. (A–C) Cell-cycle periods were calculated from the doubling time of strain LN2666 (Table S1) grown in M9-alanine medium (DT, 210 min) (A), the flow cytometry patterns shown in B, and the number of SSB-Ypet foci in individual cells shown in C. *ini*, mean time of replication initiation; *ter*, mean time of replication termination. (A) The mean number of replication origins per cell (n_{ori}) was counted after rifampicin/cephalexin treatment of exponentially growing cells (B at left of bar). The C+D period was calculated as $(DT \times \ln(n_{ori})/\ln 2)$. The duration of the C period was estimated from the pattern of SSB-Ypet foci in both snapshot (C) and time-lapse analysis. Cell-cycle periods were in good agreement with those previously published for strain MG1655 in these growth conditions (1). The mean times of loci replication (indicated in blue) were calculated from their distance to *oriC* and the replication fork velocity inferred from the duration of the C period (0.36 kb/s). The mean times of sister loci colocalization loss were calculated from the mean number of foci per cell (n_f) as $t = DT \times \ln(n_f)/\ln 2$, where t is the time separating cell division from colocalization loss. The time of septum constriction (yellow bar) was calculated from the ratio of cells harboring a constricting septum using the same formula. (B) For flow cytometry analysis, cells were grown in M9-alanine medium at 30 °C to $OD_{600} = 0.2$. Rifampicin (300 μg/mL) and cephalexin (10 μg/mL) were added when needed, followed by 4-h incubation. Cells then were fixed using cold ethanol [74% (vol/vol) final concentration] and stored at 4 °C. Fixed cells were washed twice with 100 μL of cold staining buffer (10 mM Tris, pH7.4, 10 mM $MgCl_2$), and 400 μL of a 0.4% Syto16 solution (Invitrogen) was added for 1 min before analysis using a BD FACSCalibur flow cytometer. Genome equivalents were determined using cells in stationary phase. Acquisitions were done using CellQuest Pro software. (C) Cells containing a SSB-Ypet fusion were classified depending on their number of foci and binned in 2-μm cell length classes. The percentage of cells in each class (y-axis) was plotted against cell length (x-axis).

1. Michelsen O, Teixeira de Mattos MJ, Jensen PR, Hansen FG (2003) Precise determinations of C and D periods by flow cytometry in *Escherichia coli* K-12 and *B/r*. *Microbiology* 149(Pt 4): 1001–1010.

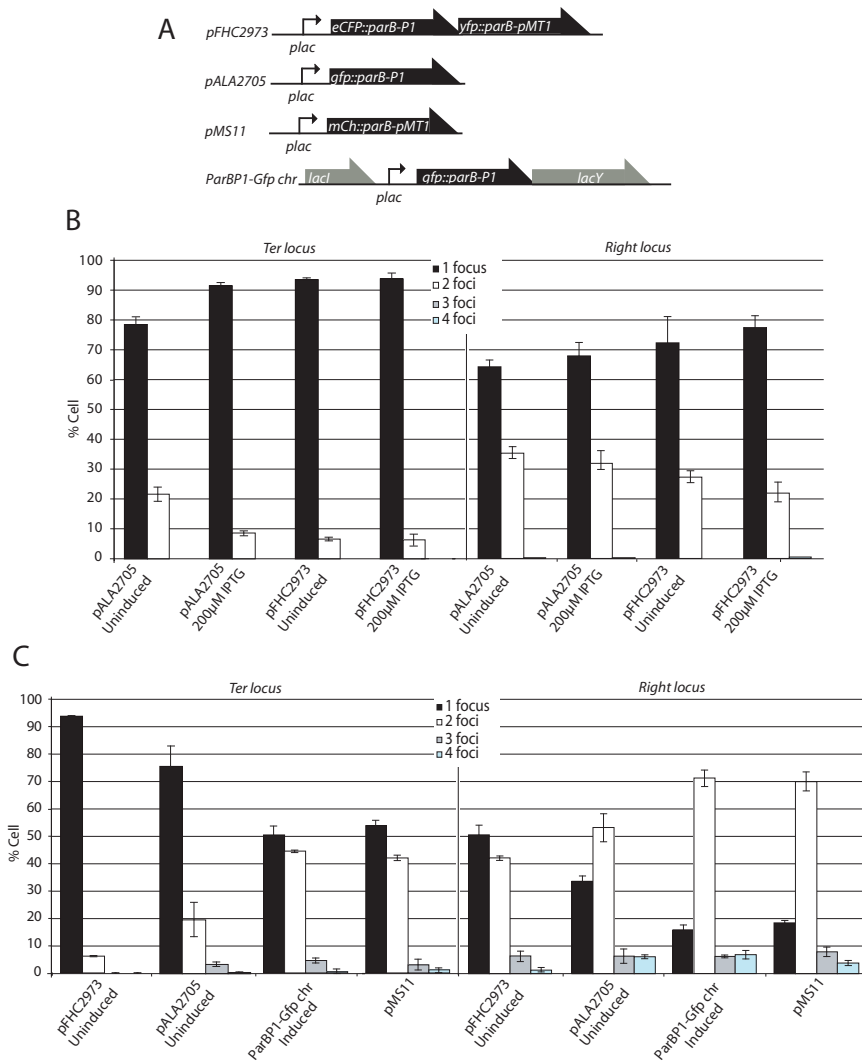


Fig. S2. Comparison of loci visualization systems. (A) Plasmids and chromosomal constructs producing ParB-fusion proteins. (B and C) Percentage of cells harboring the indicated number of foci of the *ydjJ* (*ter*) and *yhjC* (*right*) loci tagged with *parS_{pMT1}* (pMS11) or *parS_{P1}* (other lanes), when visualized using the different localization systems shown in A. (B) Cells were grown in M9 medium containing alanine as a carbon source (0.2%), thiamine (1 µg/mL), thymine (2 µg/mL), and leucine (2 µg/mL). (C) Cells were grown in the same medium, except that glycerol (0.2%) and casamino acids (0.2% final concentration) replaced alanine as a carbon source.

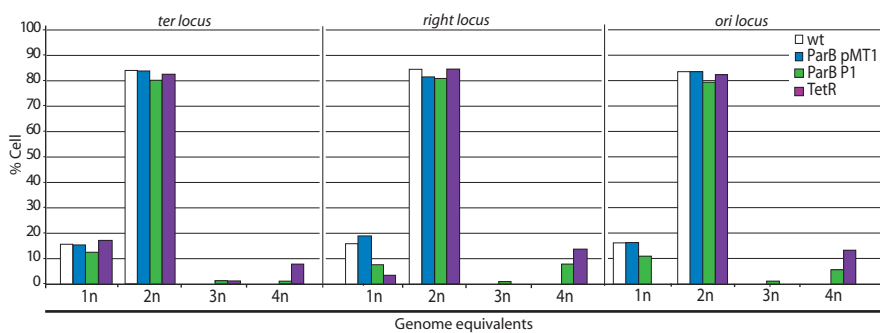


Fig. S3. Effects of loci visualization systems on the cell cycle. Wild-type LN2666 (open bars) and strains with a *ter* (*ydjJ*), *right* (*ybhJ*), or *ori* (*ilvA*) locus tagged with the indicated systems were grown in M9-alanine medium to exponential phase. Inductors were added as indicated in *Materials and Methods*; then cells were treated with cephalaxin and rifampicin for 3 h before flow cytometry analysis (see Fig. S1). The percentages of cells harboring the indicated genome equivalents are plotted.

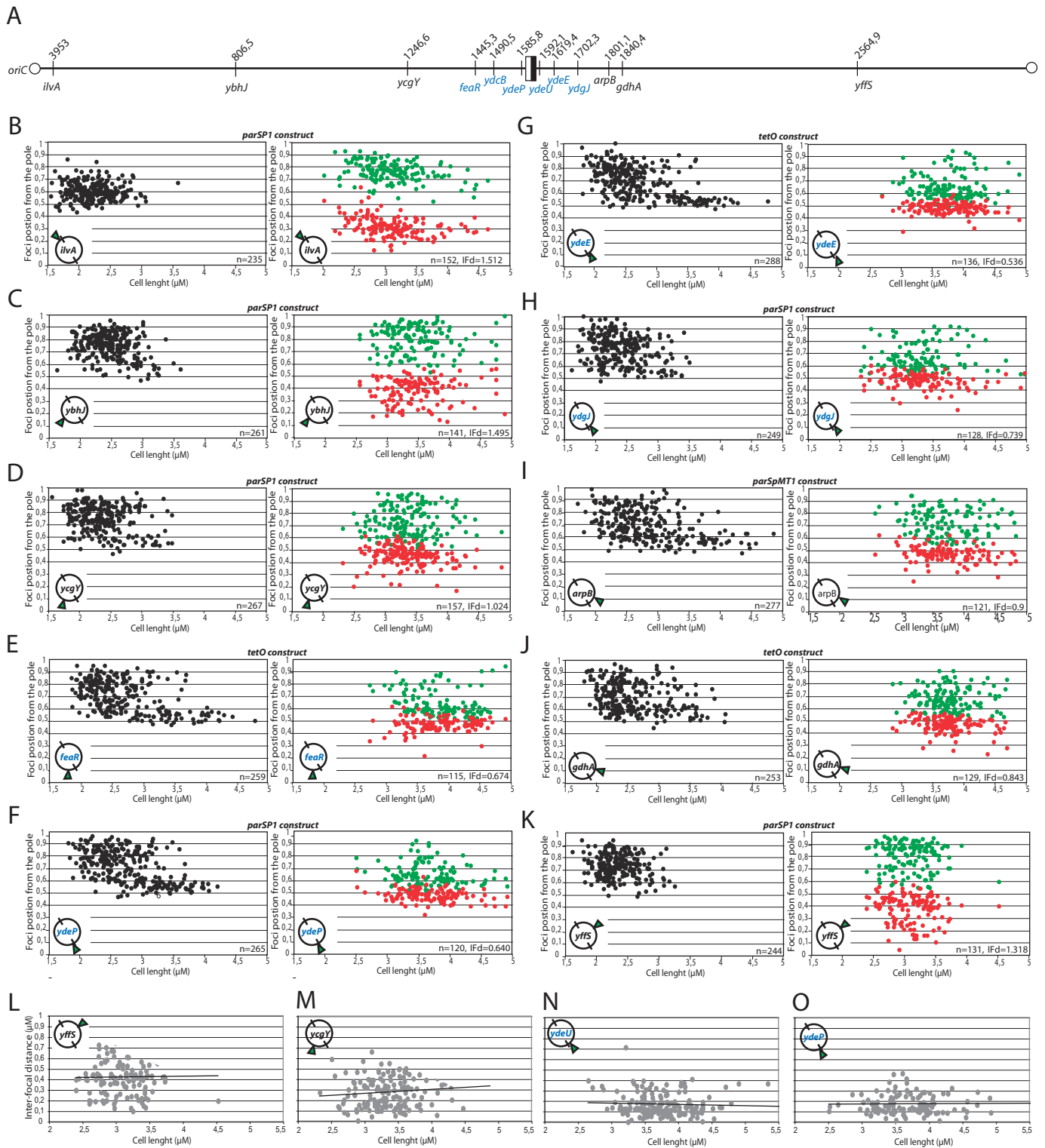


Fig. S4. Positioning of chromosome loci. (A) Map of the loci used, with coordinates indicated (see also Table S3). The black and white box represents the *dif* site, and the open circle represents the replication origin. Loci inside the region of high FtsK activity are shown in blue (1). (B–K) Position of the indicated foci of loci tagged with the indicated system from their farthest pole (y-axis) as a function of cell length (x-axis). (Left) Cells with a single focus (black dots). (Right) Cells with two foci (red and green dots). Loci positions are drawn on a circular chromosome map. The number of cells analyzed (n) and the mean interfocal distance for cells with two foci (IFd) are indicated. (L–O) The interfocal distance in cells with two foci (y-axis) was plotted as a function of cell length for the indicated loci (x-axis).

1. Deghorain M, et al. (2011) A defined terminal region of the E. coli chromosome shows late segregation and high FtsK activity. *PLoS ONE* 6(7):e22164.

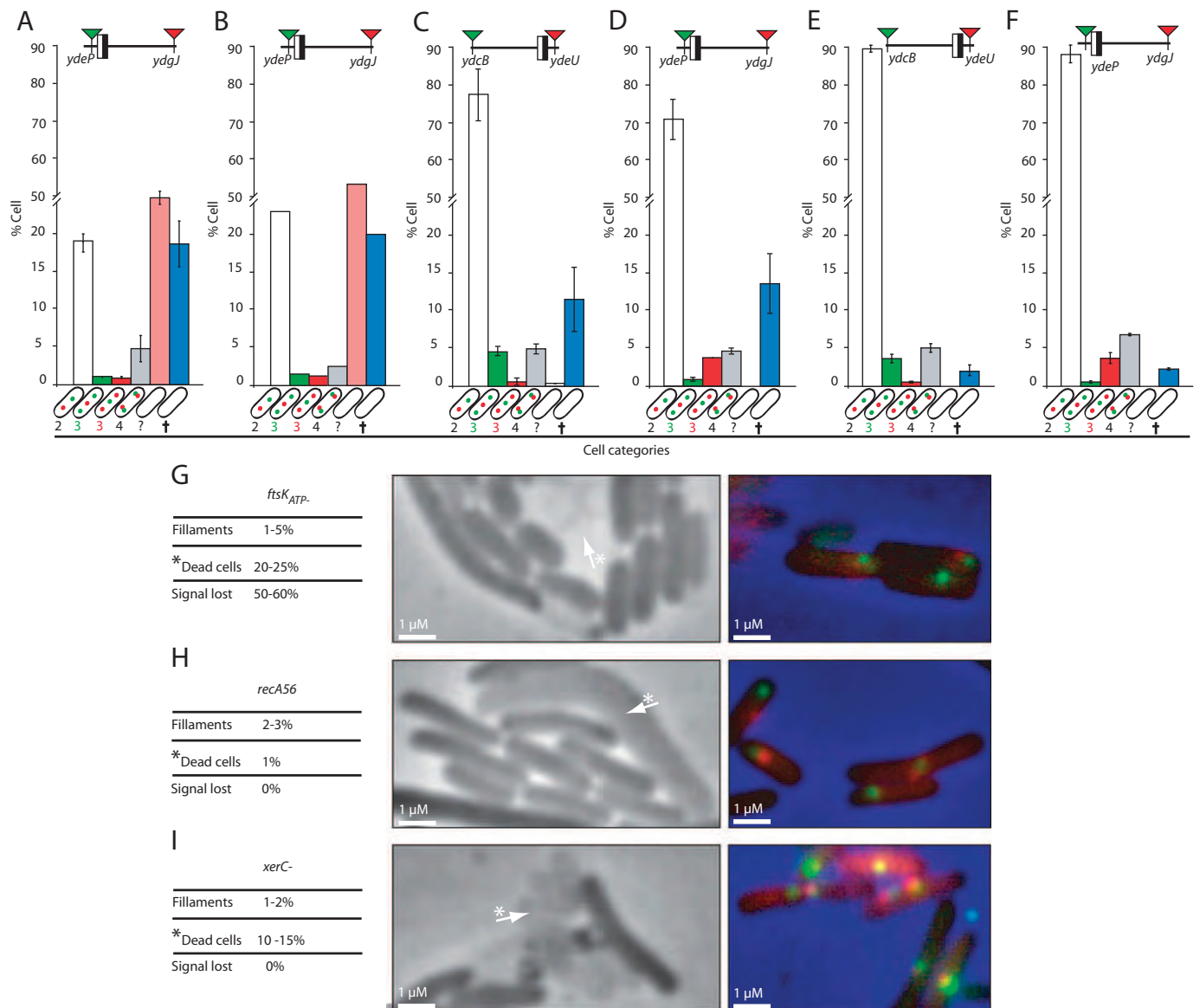


Fig. S6. Order of segregation of *ter* loci in strains carrying mutations. (A–F) Tagged loci are indicated with their position relative to *dif* (the black and white box). Red arrowheads indicate a *parS_{PMT1}* tag, and green arrowheads indicate a *parS_{P1}* tag. Cells were classified by the number of foci of each locus (shown in cartoons on the x-axis; the empty cell indicates cells that fall in none of the first four categories; blue bars indicate dead cells). Bars show the mean percentage of each category in the population (y-axis) with individual measured ranges. Data reflect at least two independent experiments and more than 600 cells. (A) *ftsK_{ATP-}* strain. (B) Δ (*ftsK_C*) strain. (C and D) *xerC-* strains. (E and F) *xerC- recA-* strains. (G and H) Analysis of micrographs of strains carrying the indicated mutation with chosen examples. Fluorescent signals were absent in about half cells in *ftsK_{ATP-}* and Δ (*ftsK_C*) strains (most cells correspond to the salmon bar in A and B). Examples of dead (empty) cells are indicated by the white arrows.

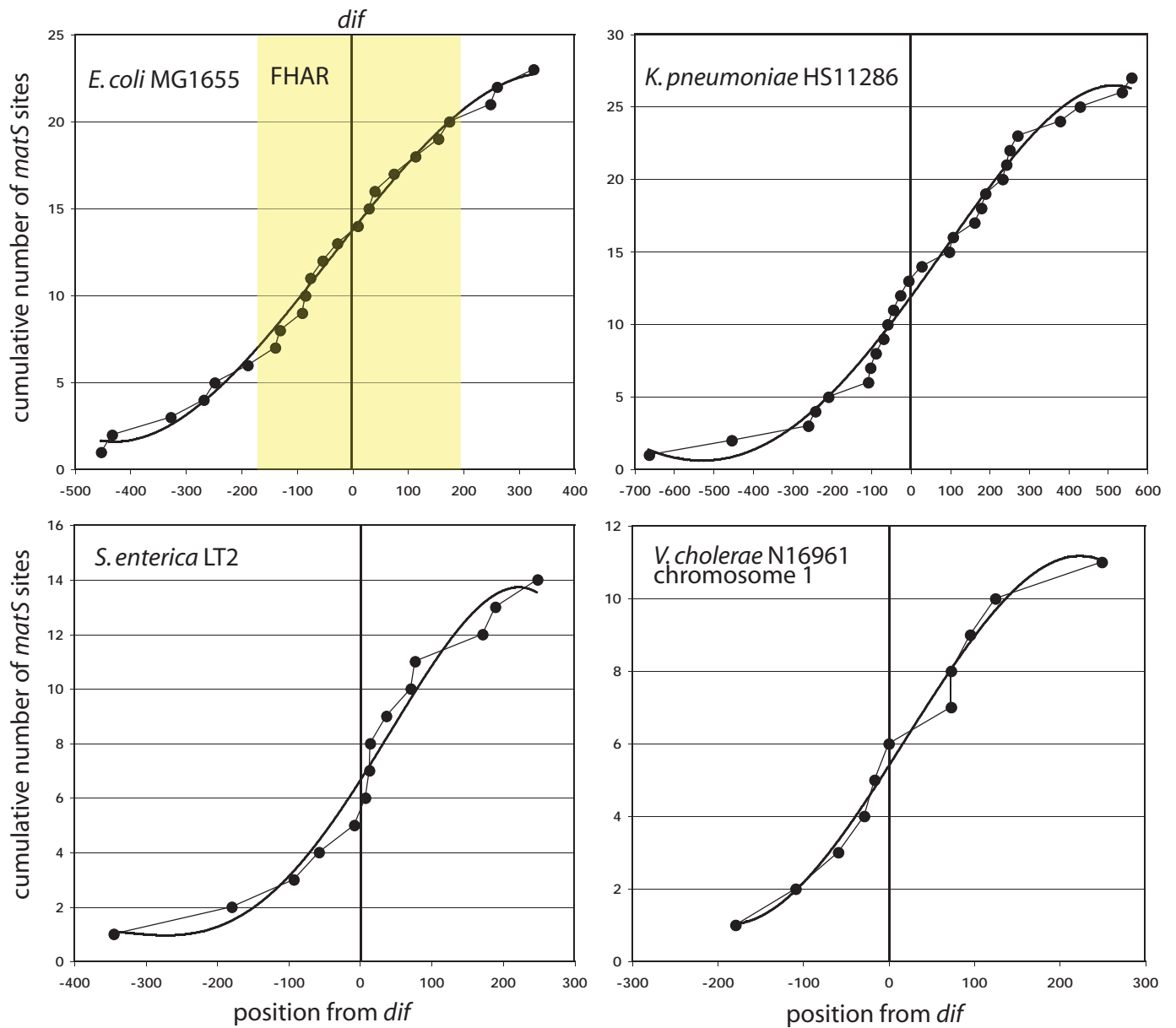


Fig. S7. Repartition of *matS* sites in *ter* regions. Panels show cumulative plots of *matS* sites (GTGACYNRGTCAC) in the chromosomal *ter* regions of the indicated bacteria (y-axis) as a function of their distance from the *dif* site (x-axis). Cumulative plots fit the sigmoid curves shown better than linear curves, indicating that *matS* sites tend to cluster in restricted regions around *dif*. In the case of *Escherichia coli* MG1655, the region of higher slope corresponds to the FtsK high-activity region (FHAR, shown in yellow).

Table S1. Strains used

Strain	Relevant genotype	Comments
Reference strains		
LN2666	W1485 W1485 F- leu thyA thi deoB or C supE rpsL (StR)	Wild-type strain (1)
MS112	LN2666 del(lacZ)::gfp-parBP1	Integration of gfp-parB P1 using pMS8*
MS154	LN2666 del(araB)::tetR-gfp	Transfer of tetR-gfp (Gift from Jean-Yves Bouet, Centre National de la Recherche Scientifique, Toulouse, France) [†]
JCT9	LN2666 SSB-Ypet	Transfer of ssb-Ypet (2)
Single-locus tagged strains		
MS158	MS112 inter(ilvA;ilvY)::parS P1-Kn	Integration of parS P1 at the ilvA-ilvY locus using pMS59*
MS159	MS112 inter(yffS;eutA)::parS P1-Kn	Integration of parS P1 at the yffS-eutA locus using pMS56*
MS182	MS112 inter(ybhJ;ybhC)::parS P1-Kn	Integration of parS P1 at the ybhJ-ybhC locus using pMS58*
MS165	MS154 inter(ybhJ;ybhC)::tetO-Gm	Integration of tetO arrays at the ybhJ-ybhC locus using pMS53*
MS144	MS112 inter(ycgY;treA)::parS P1-Kn	Integration of parS P1 at the ycgY-treA locus using pMS55*
MS167	MS154 inter(ycgY;treA)::tetO-Gm	Integration of tetO arrays at the ycgY-treA locus using pMS49*
MS168	MS154 inter(ydbL;feaR)::tetO-Gm	Integration of tetO arrays at the ydbL-feaR locus using pMS47*
MS447	MS112 inter(ydcB;trg)::parS P1	Integration of parS P1 at the ydcB-trg locus using λ Red Recombination ^{†,5}
MS11	LN2666 inter(ydcB;trg)::parS pMT1	Integration of parS pMT1 at the ydcB-trg locus using λ Red Recombination ^{†,5}
MS471	MS112 inter(ydeP;ydeQ)::parS P1	Integration of parS P1 at the ydeP-ydeQ locus using λ Red Recombination ^{†,5}
MS3	LN2666 inter(ydeP;ydeQ)::parS pMT1	Integration of parS pMT1 at the ydeP-ydeQ locus using λ Red Recombination ^{†,5}
MS472	MS112 inter(ydeU;ydeK)::parS P1	Integration of parS P1 at the hipB-ydeU locus using λ Red Recombination ^{†,5}
MS5	LN2666 inter(ydeU;ydeK)::parS pMT1	Integration of parS pMT1 at the ydeU-ydeK locus using λ Red Recombination ^{†,5}
MS163	MS154 inter(ydeE;ydeH)::tetO-Gm	Integration of tetO arrays at the ydeE-ydeH locus using pMS46*
MS146	MS112 inter(ydgJ;ydgT)::parS P1-Kn	Integration of parS P1 at the ydgJ-ydgT locus using λ Red Recombination [†]
MS164	MS154 inter(ydgJ;ydgT)::tetO-Gm	Integration of tetO arrays at the ydgJ-ydgT locus using pMS48*
MS15	LN2666 inter(ydgJ;ydgT)::parS pMT1	Integration of parS pMT1 at the ydgJ-ydgT locus using λ Red Recombination ^{†,5}
MS166	MS154 inter(gdhA;ynjL)::tetO-Gm	Integration of tetO arrays at the gdhA-ynjL locus using pMS50*
MS294	MS112 inter(ydgJ;ydgT)::parS pMT1 + pMS11	Integration of parS pMT1 at the ydgJ-ydgT locus using λ Red Recombination ^{†,5}
MS406	MS112 inter(ybhJ;ybhC)::parS pMT1 + pMS11	Integration of parS pMT1 at the ybhC-ybhJ locus using λ Red Recombination ^{†,5}
MS322	LN2666 inter(ybhJ;ybhC)::parS P1 + pFHC2973	Transfer of parS P1 from MS182 in LN2666 ^{†,5} , Transformation with pFHC2973
MS323	LN2666 inter(ybhJ;ybhC)::parS P1 + pALA2705	Transfer of parS P1 from MS182 in LN2666 ^{†,5} , Transformation with pALA2705
MS324	LN2666 inter(ydgJ;ydgT)::parS P1 + pFHC2973	Transfer of parS P1 from MS146 in LN2666 ^{†,5} , Transformation with pFHC2973
MS325	LN2666 inter(ydgJ;ydgT)::parS P1 + pALA2705	Transfer of parS P1 from MS146 in LN2666 ^{†,5} , Transformation with pALA2705
MS560	LN2666 inter(ydgJ;ydgT)::parS P1-Kn + ssb-mCherry FRT-Cm-FRT	Transfer of ssb-mCherry (Gift from Jean-Yves Bouet, Toulouse) to MS146 [†]
MS561	LN2666 inter(ycgY;treA)::parS P1-Kn + ssb-mCherry FRT-Cm-FRT	Transfer of ssb-mCherry (Gift from Jean-Yves Bouet, Toulouse) in MS144 [†]
Double-loci tagged strains		
MS291	MS112 inter(ilvA;ilvY)::parS P1-Kn, inter(ydeU;ydeK)::parS pMT1 + pMS11	Transfer of parS pMT1 from MS5 in MS158 ^{†,5} , Transformation with pMS11
MS297	MS112 inter(yffS;eutA)::parS P1-Kn, inter(ydeU;ydeK)::parS pMT1 + pMS11	Transfer of parS pMT1 from MS5 in MS159 ^{†,5} , Transformation with pMS11
MS292	MS112 inter(ybhJ;ybhC)::parS P1-Kn, inter(ydeU;ydeK)::parS pMT1 + pMS11	Transfer of parS pMT1 from MS5 in MS182 ^{†,5} , Transformation with pMS11

Table S1. Cont.

Strain	Relevant genotype	Comments
MS279	MS112 inter(ycgY;treA)::parS P1-Kn, inter(ydeU;ydeK)::parS pMT1 + pMS11	Transfer of parS pMT1 from MS5 in MS144 ^{†,§} , Transformation with pMS11
MS281	MS112 inter(ydgJ;ydgT)::parS P1-Kn, inter(ydeU;ydeK)::parS pMT1 + pMS11	Transfer of parS pMT1 from MS5 in MS146 ^{†,§} , Transformation with pMS11
MS425	MS112 inter(trg;ydcI)::parS P1, inter(ydeU;ydeK)::parS pMT1 + pMS11	Transfer of parS pMT1 from MS5 in MS447 ^{†,§} , Transformation with pMS11
MS71	MS112 inter(trg;ydcI)::parS pMT1, inter(ydeU;ydeK)::parS P1 + pMS11	Transfer of parS pMT1 from MS11 in MS472 ^{†,§} , Transformation with pMS11
MS402	MS112 inter(ydeP;ydeQ)::parS P1, inter(ydgJ;ydgT)::parS pMT1 + pMS11	Transfer of parS pMT1 from MS15 in MS471 ^{†,§} , Transformation with pMS11
MS83	MS112 inter(ydeP;ydeQ)::parS pMT1, inter(ydgJ;ydgT)::parS P1 + pMS11	Transfer of parS pMT1 from MS3 in MS144 ^{†,§} , Transformation with pMS11
MS107	MS112 inter(ydeU;ydeK)::parS P1, inter(ydgJ;ydgT)::parS pMT1 + pMS11	Transfer of parS pMT1 from MS15 in MS472 ^{†,§} , Transformation with pMS11
MS89	MS112 inter(ydeP;ydeQ)::parS P1, inter(trg, ydcI)::parS pMT1 + pMS11	Transfer of parS pMT1 from MS11 in MS471 ^{†,§} , Transformation with pMS11
MS95	MS112 inter(ydeP;ydeQ)::parS pMT1, inter(trg, ydcI)::parS pMT1 + pMS11	Transfer of parS pMT1 from MS11 in MS447 ^{†,§} , Transformation with pMS11
Strains carrying ftsK, recA, xerC, or matP mutations		
MS450	MS112 inter(trg;ydcI)::parS P1, inter(ydeU;ydeK)::parS pMT1, matP::FRT-Kn-FRT + pMS11	Transfer of matP FRT-Kn-FRT from JW0939 of the KEIO collection ^{†,§,¶}
MS451	MS112 inter(ydeP;ydeQ)::parS P1, inter(ydgJ;ydgT)::parS pMT1, matP::FRT-Kn-FRT + pMS11	Transfer of matP FRT-Kn-FRT ^{†,§}
MS367	MS112 inter(ycgY;treA)::parS P1, inter(ydeU;ydeK)::parS pMT1, matP::FRT-Kn-FRT + pMS11	Transfer of matP FRT-Kn-FRT ^{†,§}
MS480	MS112 inter(trg;ydcI)::parS P1, inter(ydeU;ydeK)::parS pMT1, ftsK-KOPSblind-Cm + pMS89	Transfer of ftsK-KOPSblind-Cm from VSO4 (3) ^{†,§}
MS481	MS112 inter(ydeP;ydeQ)::parS P1, inter(ydgJ;ydgT)::parS pMT1, ftsK-KOPSblind-Cm + pMS89	Transfer of ftsK-KOPSblind-Cm from VSO4(3) ^{†,§}
MS253	MS112 inter(ycgY;treA)::parS P1, inter(ydeU;ydeK)::parS pMT1, ftsK-KOPSblind-Cm + pMS89	Transfer of ftsK-KOPSblind-Cm from VSO4(3) ^{†,§}
MS478	MS112 inter(ydeU;ydeK)::parS pMT1, inter(ydgJ;ydgT)::parS P1, ftsK-KOPSblind-Cm + pMS89	Transfer of ftsK-KOPSblind-Cm from VSO4(3) ^{†,§}
MS479	MS112 inter(ydeU;ydeK)::parS P1, inter(ydgJ;ydgT)::parS pMT1, ftsK-KOPSblind-Cm + pMS89	Transfer of ftsK-KOPSblind-Cm from VSO4(3) ^{†,§}
MS554	MS112 inter(trg;ydcI)::parS P1, inter(ydeU;ydeK)::parS pMT1, recA56::Tc + pMS11	Transfer of recA56
MS555	MS112 inter(ydeP;ydeQ)::parS P1, inter(ydgJ;ydgT)::parS pMT1, recA56::Tc + pMS11	Transfer of recA56
MS556	MS112 inter(ycgY;treA)::parS P1-Kn, inter(ydeU;ydeK)::parS pMT1, recA56::Tc + pMS11	Transfer of recA56
MS520	MS112 inter(trg;ydcI)::parS P1, inter(ydeU;ydeK)::parS pMT1, xerC::FRT-kn-FRT + pMS11	Transfer of xerC::FRT-kn-FRT from JW3784 ^{†,¶}
MS543	MS112 inter(ydeP;ydeQ)::parS P1, inter(ydgJ;ydgT)::parS pMT1, xerC::FRT-kn-FRT + pMS11	Transfer of xerC::FRT-kn-FRT from JW3784 ^{†,¶}
MS563	MS112 inter(trg;ydcI)::parS P1, inter(ydeU;ydeK)::parS pMT1, xerC::FRT-kn-FRT, recA56::Tc + pMS11	Transfer of recA56
MS564	MS112 inter(ydeP;ydeQ)::parS P1, inter(ydgJ;ydgT)::parS pMT1, xerC::FRT-kn-FRT, recA56::Tc + pMS11	Transfer of recA56
MS537	MS112 inter(trg;ydcI)::parS P1, inter(ydeU;ydeK)::parS pMT1, ftsK ATP::cm + pMS89	Transfer of ftsK ATP- Cm(3) [†]
MS538	MS112 inter(ydeP;ydeQ)::parS P1, inter(ydgJ;ydgT)::parS pMT1, ftsK ATP::cm + pMS89	Transfer of ftsK ATP- Cm(3) [†]
MS557	MS112 inter(trg;ydcI)::parS P1, inter(ydeU;ydeK)::parS pMT1, ftsK delC::Tc + pMS11	Transfer of del(ftsKC)::Tc (3) [†]
MS540	MS112 inter(ydeP;ydeQ)::parS P1, inter(ydgJ;ydgT)::parS pMT1, ftsK delC::Tc + pMS11	Transfer of del(ftsKC)::Tc (3) [†]

St, streptomycin resistance determinant; Kn, kanamycin resistance determinant; Gm, gentamycin resistant determinant; Cm, chloramphenicol resistance determinant; Tc, tetracyclin resistance determinant.

*Transgenesis using plasmids of the pLN135 family used an integration-excision procedure described in ref. 1.

[†]Constructs tagged by resistance determinants were transferred by P1 transduction following standard procedures.

[‡]Red-mediated transgenesis was done in strain DY378 following standard procedures (5) and then were transferred to relevant strains by P1 transduction.

[§]Unless specified (parS P1-Kn), the parS P1-FRT-Cm-FRT and parS pMT1-FRT-Cm-FRT cassettes were first inserted or transferred into relevant strains, and then the Cm determinant was deleted using plasmid pCP20 (6).

[¶]The KEIO collection of E. coli gene deletion mutants is described in ref. 7.

^{||}The recA56-null allele was cotransferred by conjugation with an srl::Tn10 insertion from strains JC10240 ((Hfr PO45 recA56 srl::Tn10 thr300 ilv318 rpl300; our strain collection).

1. Cornet F, Louarn J, Patte J, Louarn J (1996) Restriction of the activity of the recombination site dif to a small zone of the Escherichia coli chromosome. *Genes Dev* 10(9):1152–1161.
2. Reyes-Lamothe R, Possoz C, Danilova O, Sherratt D (2008) Independent positioning and action of Escherichia coli replisomes in live cells. *Cell* 133(1):90–102.
3. Sivanathan V, et al. (2009) KOPS-guided DNA translocation by FtsK safeguards Escherichia coli chromosome segregation. *Molecular Microbiology* 71(4):1031–1042.
4. Barre F, et al. (2000) FtsK functions in the processing of a Holliday junction intermediate during bacterial chromosome segregation. *Genes Dev* 14(23):2976–2988.
5. Yu D, et al. (2000) An efficient recombination system for chromosome engineering in Escherichia coli. *Proc Natl Acad Sci USA* 97(11):5978–5983.
6. Datsenko KA, Wanner BL (2000) One-step inactivation of chromosomal genes in Escherichia coli K-12 using PCR products. *Proc Natl Acad Sci USA* 97(12):6640–6645.
7. Baba T, et al. (2006) Construction of Escherichia coli K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: The Keio collection. *Mol Syst Biol* 2:2006.0008.

Table S2. Plasmids used

Plasmid	Relevant genotype, construct	Comments
pALA2705	lacZp–gfp–parB P1, ApR	(1)
pFHC2973	lacZp–ecfp–parB P1–yfp–parB pMT1, ApR	(1)
pLN135	pSC101 derived, repATs,rpsL+, CmR	Transgenesis vector (2)
pMS7	pLN135 with an engineered lacI–lacY region deleted for lacZ	For Plac-driven constructs at the lacZ locus
pMS8	pMS7 with gfp–parB P1	For Integration of gfp–parB P1 at the lacZ locus or use for plasmid-driven expression
pMS11	pMS7 with mCherry–parB pMT1	For Integration of mCherry parBpMT1 at the lacZ locus or use for plasmid-driven expression
pMS89	pMS11 with a Kn resistance determinant	For plasmid-driven expression in Cmresistant strains
pMS1	pUC57 (Genscript) with a modified multiple cloning site linker, ApR	Cloning vector
pMS24	pMS1 with a parS P1–Kn cassette	Source of parS P1–Kn cassette
pGKD3–parS P1	pGB2 derivative carrying a parS P1–FRT–Cm–FRT cassette	Source of parS P1–FRT–Cm–FRT cassette (3)
pGKD3–paS pMT1	pGB2 derivative carrying a parS pMT1–FRT–Cm–FRT cassette	Source of parS pMT1–FRT–Cm–FRT cassette (4)
pMS27	pMS1 with a 4.8-kb fragment from pFX240 containing 192 tetO sites and Gm	Source of tetO–Gm cassette. pFX240 is a gift from F.-X. Barre (Centre National de la Recherche Scientifique, Gif-sur Yvette, France)
pMS34	pLN135 with an engineered ydeE–ydeH locus	For cloning cassettes at the ydeE–ydeH locus
pMS35	pLN135 with an engineered ydgJ–ydgT locus	For cloning cassettes at the ydgJ–ydgT locus
pMS38	pLN135 with an engineered ycgY–treA locus	For cloning cassettes at the ycgY–treA locus
pMS29	pLN135 with an engineered ydbL–feaR locus	For cloning cassettes at the ydbL–feaR locus
pMS42	pLN135 with an engineered gdhA–ynjL locus	For cloning cassettes at the gdhA–ynjL locus
pMS43	pLN135 with an engineered yffs–eutA locus	For cloning cassettes at the yffs–eutA locus
pMS44	pLN135 with an engineered ilvA–ilvY locus	For cloning cassettes at the ilvA–ilvY locus
pMS45	pLN135 with an engineered ybhC–ybhJ locus	For cloning cassettes at the ybhC–ybhJ locus
pMS46	pMS34 with the tetO–Gm cassette	For Integration of tetO–Gm at the ydeE–ydeH locus
pMS47	pMS29 with the tetO–Gm cassette	For Integration of tetO–Gm at the ydbL–feaR locus
pMS48	pMS35 with the tetO–Gm cassette	For Integration of tetO–Gm at the ydgJ–ydgT locus
pMS49	pMS38 with the tetO–Gm cassette	For Integration of tetO–Gm at the ycgY–treA locus
pMS50	pMS42 with the tetO–Gm cassette	For Integration of tetO–Gm at the gdhA–ynjL locus
pMS53	pMS45 with the tetO–Gm cassette	For Integration of tetO–Gm at the ybhJ–ybhC locus
pMS55	pMS38 with parS P1–Kn cassette	For Integration of parS P1–Kn at the ycgY–treA locus
pMS56	pMS43 with parS P1–Kn cassette	For Integration of parS P1–Kn at the yffs–eutA locus
pMS57	pMS35 with parS P1–Kn cassette	For Integration of parS P1–Kn at the ydgJ–ydgT locus
pMS58	pMS45 with parS P1–Kn cassette	For Integration of parS P1–Kn at the ybhC–ybhJ locus
pMS59	pMS44 with parS P1–Kn cassette	For Integration of parS P1–Kn at the ilvA–ilvY locus

1. Nielsen HJ, Ottesen JR, Youngren B, Austin SJ, Hansen FG (2006) The Escherichia coli chromosome is organized with the left and right chromosome arms in separate cell halves. *Mol Microbiol* 62(2):331–338.
2. Cornet F, Louarn J, Patte J, Louarn J (1996) Restriction of the activity of the recombination site dif to a small zone of the Escherichia coli chromosome. *Genes Dev* 10(9):1152–1161.
3. Espeli O, Mercier R, Boccard F (2008) DNA dynamics vary according to macrodomain topography in the E. coli chromosome. *Mol Microbiol* 68(6):1418–1427.
4. Mercier R, et al. (2008) The MatP/matS site-specific system organizes the terminus region of the E. coli chromosome into a macrodomain. *Cell* 135(3):475–485.

Table S3. Insertion used for loci positioning

Region	Tagged loci*	Insertion site [†]	Site inserted
<i>ori</i>	<i>ilvA</i> - <i>ilvY</i>	3,954,537 bp, GGCCTACCCG▼CGCGACAACG	parS-P1
<i>left</i>	<i>yffS</i> - <i>eutA</i>	2,563,422 bp, GCACCACAAT▼TACCCCAACC	parS-P1
<i>right</i>	<i>ybhJ</i> - <i>ybhC</i>	805,098 bp, TAAGGCATTT▼TCGCAGCATC	parS-P1, parS-pMT1, tetO array
<i>ter</i>	<i>ycgY</i> - <i>treA</i>	1,244,862 bp, ACAACGCCAT▼CCGGAGAAGC	parS-P1, parS-pMT1, tetO array
<i>ter</i>	<i>ydbL</i> - <i>feaR</i>	1,444,309 bp, AATATTCAAA▼AACTCCTGTC	tetO array
<i>ter</i>	<i>ydcB</i> - <i>trg</i>	1,490,280 bp, CGAAAATAAT▼CACTTCACGA	parS-P1, parS-pMT1
<i>ter</i>	<i>ydeP</i> - <i>ydeQ</i>	1,584,724 bp, TCTTACAGGT▼GTAGGCTAAT	parS-P1, parS-pMT1
<i>ter</i>	<i>ydeU</i> - <i>ydeK</i>	1,592,139 bp, TTGCCGACTT▼CAAACGGCGC	parS-P1, parS-pMT1
<i>ter</i>	<i>ydeE</i> - <i>ydeH</i>	1,620,588 bp, TCGTTTAGGT▼TACCTTGCT	tetO array
<i>ter</i>	<i>ydgJ</i> - <i>ydgT</i>	1,702,639 bp, TGCTGGAGCT▼ATTATTGCTA	parS-P1, parS-pMT1, tetO array
<i>ter</i>	<i>arpB</i> - <i>ydiY</i>	1,803,178 bp, GAGATATGCA▼GGACACTGGT	parS-pMT1
<i>ter</i>	<i>gdhA</i> - <i>ynjL</i>	1,841,750 bp, GGCCTACAAA▼TGGGCACAAT	tetO array

*Sites were inserted in intergenic regions of converging genes and named after the first gene (bolded).

[†]The insertion coordinates are given (in bp) with the surrounding sequence (arrowheads show the insertion position).

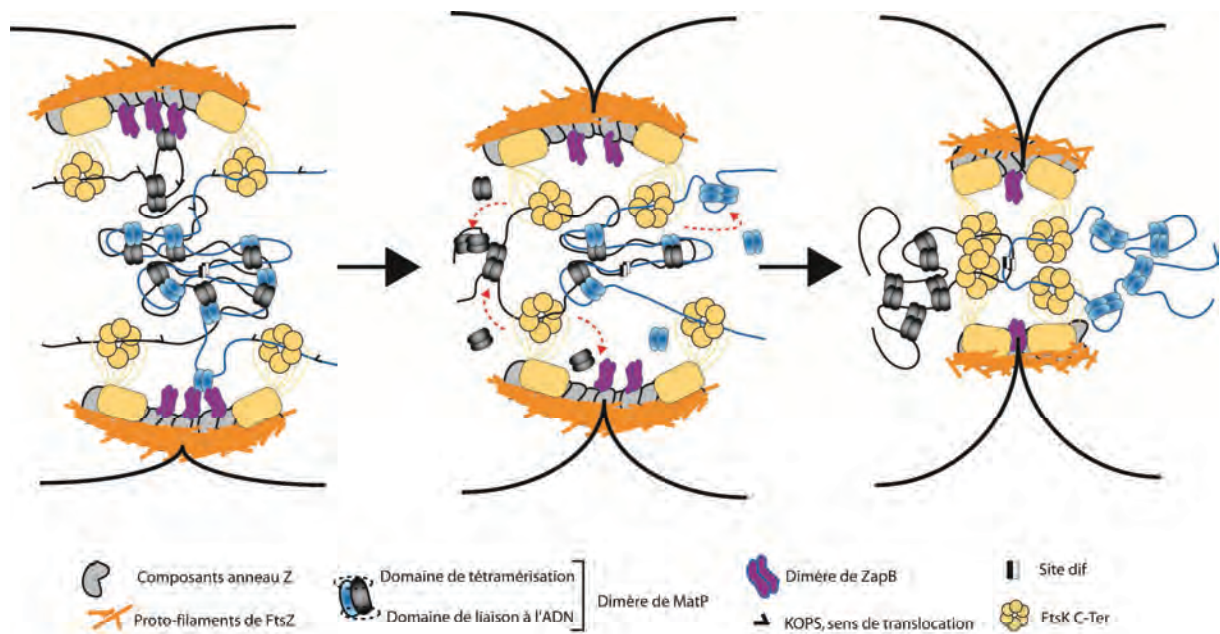


Figure 33 - Modèle de ségrégation de la région de forte activité de FtsK

En fin de cycle cellulaire quand la région Terminale a été répliquée, la région est maintenue au centre de la cellule par une interaction en périphérie de cette région entre ZapB et MatP. FtsK par son activité de translocation ATP dépendante, nettoie l'ADN de toutes les protéines interagissant avec lui le temps de la translocation, dont MatP. MatP est nécessaire pour le maintien de la condensation de la région Terminale en un Macro Domaine. Ainsi, en enlevant MatP, FtsK supprime progressivement les interactions MatP/ZapB comme MatP/MatP et permet la ségrégation progressive des *loci* en direction du site *dif* qui est le dernier point de contact entre les deux chromosomes frères. L'ordre de ségrégation de la FHAR dépend de MatP et de FtsK.

2.4-Discussion et modèle

Le profil de ségrégation du chromosome est divisé en trois temps. L'origine est ségrégée en premier, puis les régions Left, Right et les *loci* en dehors de la FHAR sont ségrégés dans la même fenêtre de temps, et enfin la région de forte activité de FtsK (FHAR) est ségrégée. Nos résultats montrent que la région Terminale est ségrégée de manière orientée et progressive : des *loci* en dehors de la FHAR, vers le site *dif*, qui semble être le dernier point de contact entre les deux chromosomes frère. Cet ordre de ségrégation dépend de la translocation orientée de l'ADN par FtsK en direction du site *dif*. Cette translocation s'effectue non seulement sur les dimères de chromosome, mais aussi sur les monomères. Nos résultats montrent qu'il existe une priorité très précise de l'ordre de ségrégation des *loci* dans la FHAR. Cela suggère l'importance de la ségrégation de la région périphérique au site *dif* (10 kb) en dernier, où sont résolus les dimères de chromosome, et où l'activité de décaténation de la TopoIV est la plus élevée. Nous montrons aussi que MatP organise la FHAR et uniquement la FHAR, en un bon « substrat » pour la translocation médiée par FtsK.

Les pourcentages qui nous permettent d'affirmer qu'un *locus* est ségrégé avant un tel, sont faibles (<15%) par rapport au pourcentage de cellule analysées. C'est essentiellement dû à la tardiveté des événements de ségrégation de la région Terminale dans nos conditions de croissance (**Figure S1A, Stouf 2013**).

Pour expliquer le profil de ségrégation ordonné, précis et orienté dans la région autour du site *dif* que nous avons observé, nous avons construit un modèle simple qui repose sur la capacité de FtsK à « nettoyer » l'ADN lors de sa translocation (**Figure 33**). La région Terminale est organisée au centre de la cellule en fin de cycle et cette organisation repose sur l'interaction MatP/ZapB et la présence de caténanes. Comme présenté précédemment, (**Figure S7, Stouf 2013**), la concentration en *matS* autour du site *dif* est intense dans une région de 400kb assimilée à la FHAR. Les protéines MatP d'un chromosome frère peuvent interagir avec les MatP de l'autre chromosome frère, ce qui fait que dans la région centrale de la cellule en fin de cycle cellulaire, MatP en plus de maintenir la région Terminale au centre de la cellule via l'interaction avec ZapB, maintient une certaine cohésion entre les *loci* des deux chromosomes frères. La région Terminale est organisée en son centre, en un noyau dur et plus condensé que le reste de la région Terminale qui correspond à la FHAR. Quand FtsK transloque l'ADN une fois le septum mis en place, elle va commencer par les régions les plus accessibles ; celles qui sont le moins compactées en périphérie du nucléoïde. En transloquant l'ADN, FtsK ne donne pas de force pour ségréger l'ADN de part son activité de translocation comme un système Par.

Nous supposons que FtsK, en enlevant comme SpoIIIE toutes les protéines présentes sur l'ADN dans cette région, enlève progressivement les forces de cohésion et condensation maintenues par l'interaction MatP/MatP, MatP/ZapB et les autres protéines de liaison à l'ADN dans cette région (**Marquis 2008**). FtsK permet ainsi la ségrégation progressive des *loci*. Dans ce modèle, la résolution des caténanes par la Topoisomérase IV n'est pas prise en compte : il faudrait pour cela savoir à quel moment du cycle cellulaire sont résolus les derniers caténanes. Nous savons qu'une interaction physique entre la Topo IV et FtsK a été observée (**Espeli 2003**) et que le domaine C-Ter de FtsK module l'activité de la Topo IV (**Bigot 2010**). Cependant, nous ignorons quand cette interaction a lieu en fin de cycle cellulaire. Peut-être que tout comme l'hypothèse selon laquelle MukB séquestrerait un certain taux de protéine ParC (sous unité de la Topoisomérase IV), on peut supposer que le maintien de la condensation / cohésion par MatP séquestre une certaine quantité de protéine ParC dans la région Terminale. Ces ParC sont relâchées progressivement par la translocation de FtsK et permettent ensuite la résolution des derniers caténanes.

2.5-Résultats complémentaires

Précédemment, nous avons montré que FtsK transloque activement tous les chromosomes, mais nous n'avons décrit l'activité de FtsK que pour le maintien d'un ordre de ségrégation précis. Comme décrit précédemment (**Stouf 2013**), les différents mutants de FtsK (DelC, ATP-) possèdent un phénotype qui ne permet pas d'analyser les données de microscopie (débris cellulaires trop importants, fluorescence diffuse). Le mutant FtsK KOPSb, où l'activité de FtsK n'est plus orientée sur le chromosome, est le seul à avoir un effet sur l'activité de FtsK sans altérer significativement la viabilité de la souche. Nous avons montré que dans un tel mutant, FtsK ne maintient plus l'ordre de ségrégation des *loci* dans la FHAR. Nous avons aussi observé précédemment que l'activité de FtsK dans la FHAR, est la même dans un mutant FtsK KOPSb que dans la souche sauvage (**Figure 28C**). Dans un mutant FtsK KOPSb, les chromosomes sont donc toujours ségrégués, mais l'ordre de ségrégation des *loci* dans la FHAR est altéré.

Notre objectif dans ces résultats complémentaires est de préciser l'effet de l'orientation de FtsK sur les phénotypes de ségrégation observés. Nous avons décidé d'étudier la dynamique de la région Terminale quand l'orientation de l'activité de translocation de FtsK est modifiée. Ceci pour savoir si dans un tel contexte mutant : (i) Le timing de l'assemblage

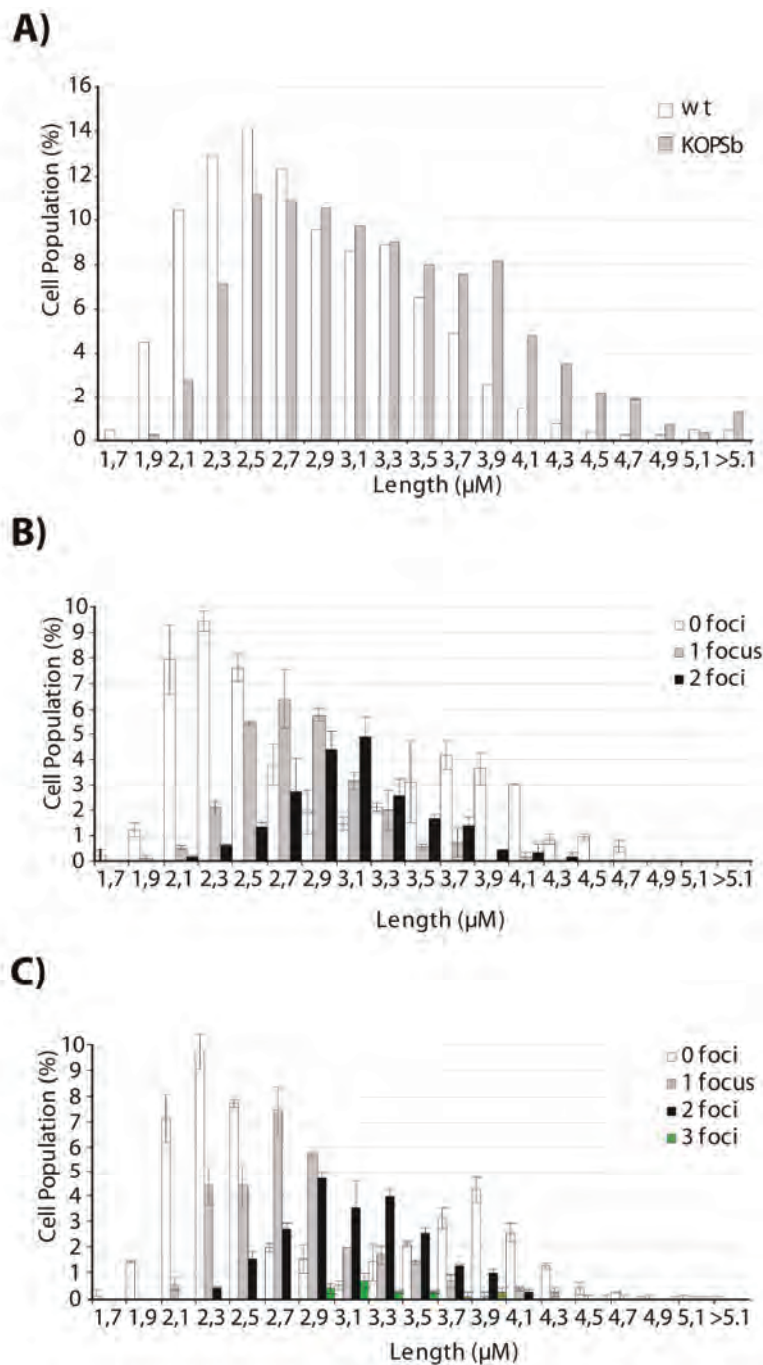


Figure 34 - Analyse du phénotype mutant FtsK KOPSb

(A) Comparaison de la longueur des cellules entre la souche sauvage et la souche FtsK KOPS blind. **(B)** Analyse du profil répliatif de la souche sauvage avec SSB-yfp comme marqueur du réplisome. La période répliatif correspond à l'apparition et disparition des *foci* (en blanc). **(C)** Analyse du profil répliatif de la souche FtsK KOPSb avec SSB-yfp comme marqueur du réplisome.

de l'anneau FtsZ est altéré ? (ii) Le timing d'assemblage de FtsK au septum est modifié ? (iii) Le timing des dernières étapes de la septation, ont changé ?

L'utilisation d'acteurs de la fin du cycle (ZapB/ZapA et FtsK) et un *locus* chromosomique marqués, nous permettrait de décrire en contexte sauvage et FtsK KOPSb ces différents timings. Ceci, de manière à préciser le rôle de l'orientation de l'activité de translocation de FtsK dans la chorégraphie de la région Terminale.

2.5.1-Analyse du phénotype réplcatif et divisionnel en KOPSb

Afin de décrire le rôle de l'orientation de FtsK dans la dynamique de la région Terminale, nous avons caractérisé le phénotype du mutant FtsK KOPS, puisque jusqu'à présent, et même dans la publication précédente, nous n'avons pas décrit ce phénotype en détails. Ici, nous montrons que la souche FtsK KOPSb possède en moyenne des cellules plus longues que la souche sauvage (**Figure 34A**). L'allongement de la taille est homogène et concerne toutes les cellules, ce qui est consistant avec le fait que, le mutant FtsK KOPSb ségrége la FHAR dans toutes les cellules comme décrit précédemment (**Figure 28C**). Cette observation nous permet de suggérer que la mauvaise orientation de FtsK sur l'ADN dans la FHAR retarde la division cellulaire de toutes les cellules.

Nous nous sommes ensuite intéressés au profil réplcatif en contexte FtsK KOPSb. Nous remarquons que le profil de réplcation de la souche sauvage (**Figure 34B**) semble similaire à celui de la souche FtsK KOPSb (**Figure 34C**), sauf l'apparition de cellules avec trois *foci* suggérant un chevauchement de cycles réplcatif dans certaines cellules. Or, nous avons observé que la longueur des cellules de la souche KOPSb est moyennement plus grande que pour la souche sauvage (**Figure 34A**). Avec cette fusion SSB-Ypet qui marque les réplisomes, l'augmentation de taille n'est pas observée entre les souches sauvages et KOPSb. Il se trouve que la fusion SSB-yfp utilisée pour analyser le profil de réplcation, possède le *locus ssb* sauvage en plus de la copie avec la fusion *ssb::yfp*. Il a été suggéré que cette souche altère les paramètres du cycle cellulaire et que dans notre cas, elle pourrait modifier ceux de la souche sauvage et KOPSb. Pour cela, nous avons utilisé une construction DnaQ-yfp (DnaQ est aussi un composant des réplisomes), mais le profil réplcatif reste similaire à la souche sauvage. Les constructions SSB-Yfp et DnaQ-ytp altèrent donc le phénotype des souches analysées. Nous n'avons donc pas pu décrire une différence de cycle réplcatif de la KOPSb avec une construction SSB/DnaQ-yfp. Une alternative aurait été d'analyser la souche FtsK KOPSb par cytométrie et via une macro Excel publiée récemment permettant d'extraire la durée de la période C (**Stokke 2012**).

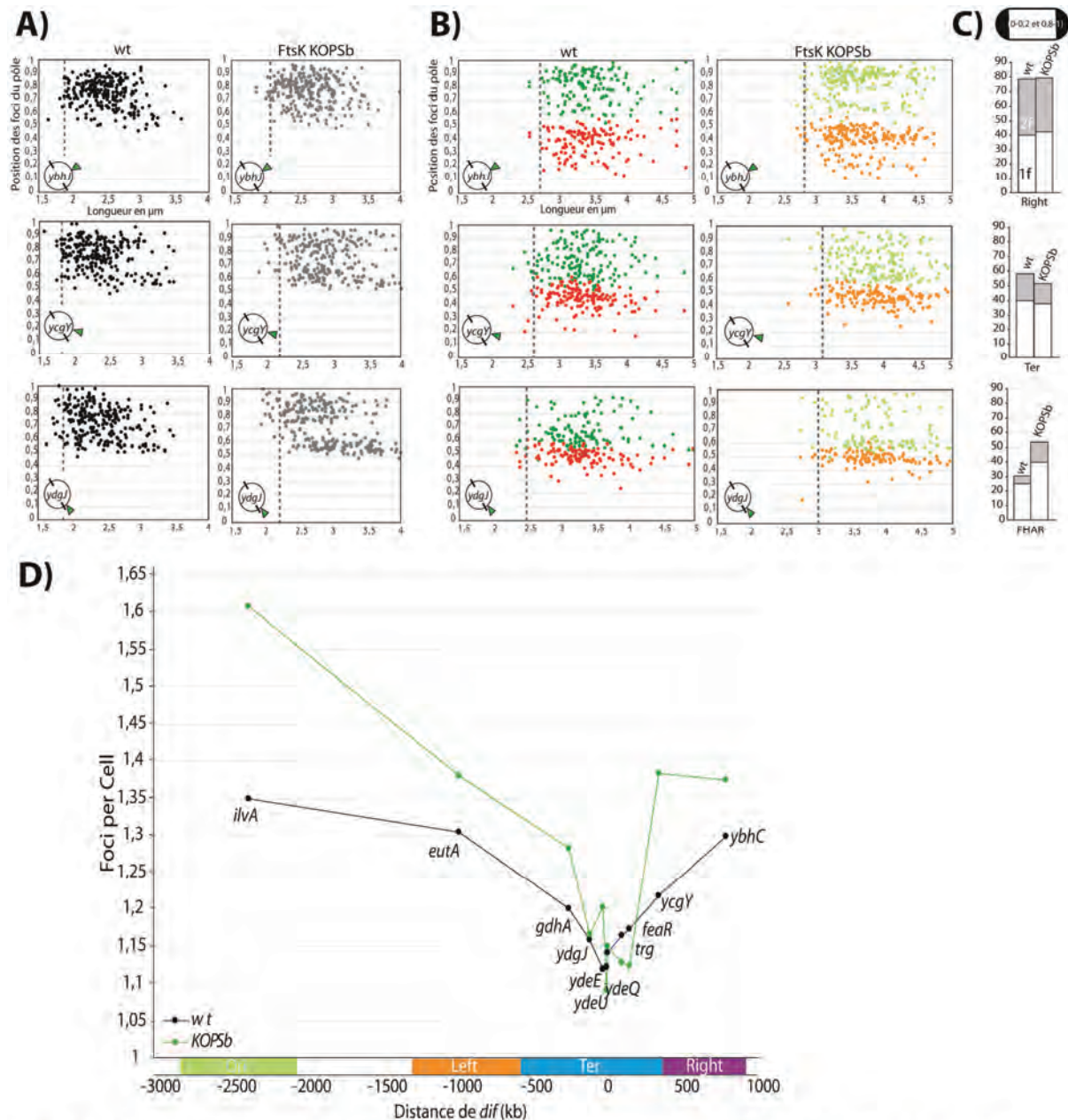


Figure 35 - Positionnement de *loci* dans la région Terminale dans un contexte FtsK KOPSb

(A) Localisation dans la longueur des cellules avec un focus de trois *loci* chromosomique (MD droit, en dehors de la FHAR et à proximité du site *dif*), dans la souche sauvage (points noirs) et en KOPSb (points gris). (B) Idem mais pour les cellules avec deux foci. Les barres en pointillé représentent approximativement le début de perte de co-localisation du locus marqué. (C) Pourcentage du nombre de cellules possédant au pôle un ou deux foci (deux foci dans la même moitié de cellule, l'un étant au pôle) en fonction du locus marqué (un focus en blanc et deux foci en gris). (D) Nombre moyen de foci par cellule dans la souche sauvage (noir) et KOPSb (vert).

Nous voulions ensuite nous intéresser aux timings de la formation précoce et tardive du septum de division ainsi qu'à la fin de formation du septum en conditions sauvages et FtsK KOPSb. Nous voulions comparer le positionnement du septum de division entre la souche sauvage et FtsK KOPSb, pour savoir si la perte du sens de translocation de FtsK, peut influencer le processus de septation comme dans le modèle décrit précédemment (**Dubarry 2012**) (**Figure 24C**). Pour cela, l'analyse de milliers de cellules via MicrobeTracker (**Sliusarenko 2011**) a été initiée par Elise Lebailly dans différents contextes mutants. La comparaison des pourcentages de cellules avec un septum entre la souche sauvage et la souche FtsK KOPSb, corrélées avec le nombre de cellules avec un septum marqué par une fusion ZapB-xfp, nous permettraient de conclure s'il y a un retard ou non sur la formation du septum dans le mutant FtsK KOPSb. Ces analyses nous permettront de placer les différents événements de fin du cycle cellulaire en contexte sauvage et FtsK KOPSb.

Nous savons que FtsK maintient l'ordre de ségrégation des *loci* dans la région autour du site *dif* (FHAR) comme décrit précédemment (**Stouf 2013**). La question est donc de savoir maintenant si un changement dans l'ordre de ségrégation des *loci* de cette région peut retarder la fin de septation.

2.5.2-FtsK sépare la ségrégation de la FHAR du reste du chromosome.

Nous avons précédemment montré que la région de forte activité de FtsK dispose d'une période de co-localisation prolongée au centre de la cellule avant d'être ségrégée (**Figure 3, Stouf 2013**). Dans un mutant FtsK KOPSb, FtsK ne transloque plus systématiquement les *loci* dans une orientation *ori*→*dif*. De ce fait, FtsK peut aussi transloquer les *loci* de la FHAR dans l'orientation *dif*→*ori*. La ségrégation des *loci* dans la FHAR serait donc retardée.

Nous avons alors observé la localisation de *loci* dans les cellules avec la région Terminale ségrégée et non ségrégée dans la souche FtsK KOPSb par rapport à la souche sauvage (**Figure 35A**). On remarque que la ségrégation de tous les *loci* est retardée dans le mutant FtsK KOPSb car les cellules sont plus longues (trait en pointillé) que dans la souche sauvage. Mais surtout, que la ségrégation du *locus* dans la FHAR (*ydgJ*), est plus retardée que les autres : les *loci* sont relativement plus présents au centre de la cellule. Nous observons aussi qu'une fois les *loci* ségrégés, ceux dans la FHAR sont toujours présents plus longtemps au centre de la cellule que ceux des autres *loci* observés en dehors de la FHAR (**Figure 35B**). Pour des *loci* marqués dans la FHAR autre que le *locus ydgJ* (*trg*, *ydeU*, *ydeQ*, etc...), des résultats similaires ont été observés. Si on s'intéresse à la localisation au pôle de *loci*

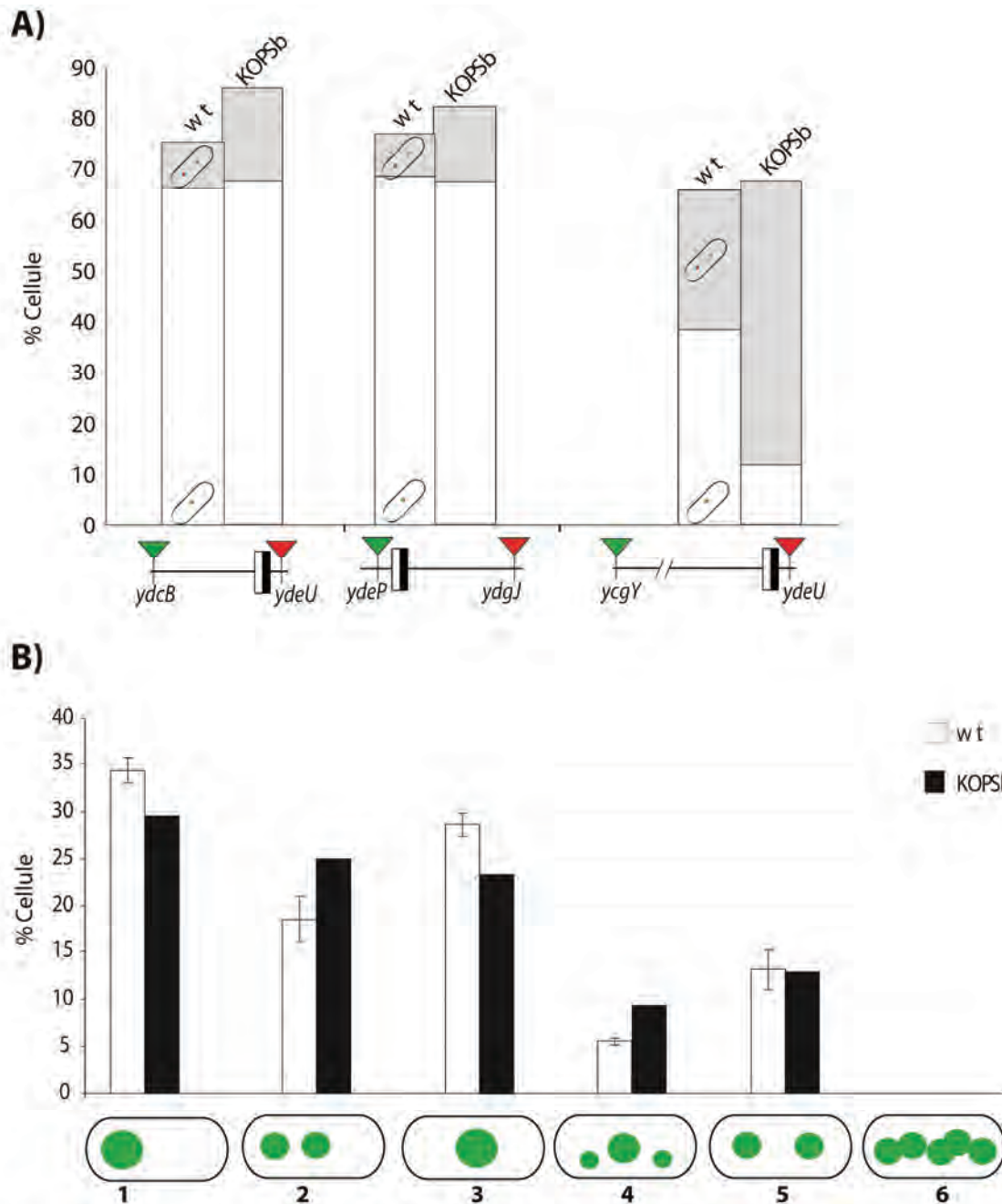


Figure 36 - Organisation de la région Terminale en FtsK KOPSb

(A) Représentation en fonction des *loci* marqués, du pourcentage de cellules avec deux *foci* co-localisés (en blanc) et non co-localisés (en gris). Trois souches sont représentées avec deux *loci* marqués. Deux souches avec deux *loci* marqués dans la FHAR. Une souche avec un *focus* en dehors de la FHAR de marqués. Les pourcentages ont été mesurés dans la souche sauvage et FtsK KOPSb. **(B)** Représentation en différentes classes de cellules, de la position de la région Terminale (MatP-Gfp) dans une souche sauvage et FtsK KOPSb. Les catégories représentent les différentes étapes de la migration de la région Terminale au centre de la cellule (1 à 3) et de sa ségrégation (4 et 5).

chromosomique dans la souche sauvage et KOPSb, on remarque qu'uniquement les *loci* dans la FHAR sont plus polaires. On remarque aussi que, le nombre moyen de *foci* par cellule augmente pour tous les *loci* mais pas pour ceux dans la FHAR quand l'activité de FtsK n'est plus orientée en direction du site *dif* (**Figure 35D**). Ces résultats suggèrent que l'orientation de l'activité de translocation de FtsK, isole la ségrégation de la FHAR du reste du chromosome.

2.5.3-L'orientation de l'activité de FtsK affecte la co-localisation de la FHAR avec le reste du chromosome.

Précédemment, nous avons montré que l'ordre de ségrégation des *loci* dans la FHAR dans une souche FtsK KOPSb est altéré (**Stouf 2013**). Dans ces souches, le nombre de cellules possédant un *focus* pour chaque *locus* marqué (catégorie 1) augmente par rapport à la souche sauvage (**Figure 32C**). La catégorie n°1 des histogrammes précédant (**Stouf 2013**) a été séparée en deux sous catégories : les cellules avec les deux *foci* co-localisés et celles avec deux *foci* non co-localisés (Blanc et Gris, **Figure 36A**). On remarque alors qu'au sein même de la FHAR, il n'y a pas ou peu de changement en comparaison avec la souche sauvage, ce qui suggère que l'orientation de l'activité de FtsK n'influe pas sur la condensation de la FHAR. Cependant, pour un *locus* marqué dans la FHAR (*ydeU*) et un marqué en dehors (*ycgy*), on remarque que dans la souche FtsK KOPSb, le pourcentage de cellules avec des *loci* distants augmente avec la baisse du pourcentage de cellules avec deux *foci* co-localisés. Ce résultat suggère que l'orientation de l'activité de FtsK est responsable de la condensation entre les *loci* dans la FHAR et ceux en dehors : dans ces conditions, FtsK retarde la ségrégation de la FHAR par rapport au reste du chromosome.

2.5.4-L'orientation de l'activité de FtsK ne modifie pas l'organisation du MD Ter

Nous nous sommes ensuite intéressés au positionnement de la région Terminale dans la cellule quand l'activité de FtsK n'est plus orientée sur le chromosome (**Figure 36B**). Quand la région Terminale est marquée par une fusion MatP-Gfp (**Mercier 2008**), différentes catégories en fonction de la position et du nombre de *foci* dans la cellule ont été répertoriées et classées selon les étapes du cycle cellulaire. Nous n'observons pas de différences importantes entre la souche sauvage et la souche KOPSb pour chacune de ces catégories. L'activité de FtsK n'altère pas ou peu la position de la région Terminale au cours du cycle cellulaire, même si on a observé précédemment une localisation de *loci* dans la FHAR plus polaire en début de

cycle cellulaire (**Figure 35B**). L'analyse de la localisation de la région Terminale dans la souche FtsK KOPSb n'a été effectuée qu'une seule fois et indépendamment de la longueur des cellules : une analyse en prenant en compte ce paramètre de longueur, pourrait aider à préciser cette première analyse. L'observation du nombre de cellules possédant un nucléoïde bilobé (qui marque la migration de la région Terminale au centre de la cellule pour y être répliqué) ne devrait pas ou peu changer selon cette idée là mais reste à tester. Ces premiers résultats tendent à décrire plus précisément le rôle de l'orientation de FtsK dans la dynamique globale du chromosome en fin de cycle cellulaire. Nous montrons que l'altération de l'orientation de translocation de FtsK sépare la ségrégation de la région Terminale du reste du chromosome.

Ces données manquent de substance puisqu'elles sont incomplètes ; les données pour mesurer dans le temps les différentes étapes de la septation en KOPSb ne sont pas encore réalisées.

3-La dynamique de la région Ter contrôle la fin du cycle cellulaire.

Après réplication d'un *locus*, les deux copies néo-répliquées restent co-localisées durant une période variable dépendante de l'activité de la Topoisomérase IV appelée cohésion (**Figure 14**). La région Terminale du chromosome de *Escherichia coli* possède une période de cohésion étendue comparée à la majorité des *loci* chromosomiques (sauf les SNAPs décrits en introduction).

La dynamique de la région Terminale est particulière au cours du cycle cellulaire. Elle est localisée au niveau du nouveau pôle en début de cycle et migre progressivement au centre de la cellule pour y être répliquée. La formation du septum assure le maintien de la région Terminale au centre de la cellule via l'interaction entre ZapB, qui intervient dans la stabilité de l'anneau Z, et MatP qui organise la région Terminale en un Macro Domaine. La ségrégation de la région Terminale est scindée en plusieurs étapes. Les *loci* périphériques de la région Terminale sont ségrévés dans la même fenêtre de temps que les *loci* dans les régions Left et Right, puis ceux dans la région de Forte Activité de FtsK (FHAR), qui disposent d'une cohésion étendue, sont ségrévés en dernier (**Deghorain 2011, Stouf 2013**). La ségrégation de la FHAR est ordonnée est progressive. L'ordre de ségrégation des *loci* de la FHAR dépend du sens d'orientation de FtsK sur le chromosome et de la présence de MatP qui permet la translocation de FtsK dans cette région.

La formation du septum de division est localisée au centre de la cellule et cette localisation est régi par deux mécanismes complémentaires : le système MinCDE qui empêche la formation de l'anneau Z aux pôles des cellules par l'oscillation d'un pôle à l'autre de MinC (**Figure 25**), et le mécanisme d'Occlusion du Nucléoïde régi par SlmA (**Figure 26**). SlmA inhibe la formation des proto-filaments de FtsZ spatio-temporellement (**Tonthat 2013**). SlmA se lie au niveau de séquences SBS qui sont présentes partout sur le chromosome d'*E. coli* sauf dans la région Right et la région Terminale (**Cho 2011**). La localisation subcellulaire de SlmA est importante pour contrôler la mise en place du septum. Une fois les régions possédant des SBS ségrévées (SlmA n'étant active qu'en dimère sur les SBS), la formation des proto-filaments de FtsZ n'est plus inhibée (**Figure 27**). La fin du mécanisme d'occlusion du nucléoïde débiterait quand la région Terminale a migrée au centre de la cellule, ce qui correspond au nucléoïde splitting (nucléoïde bilobé) décrit précédemment. Comme présenté **Figure 26**, MatP, au contraire de SlmA, se fixe uniquement dans la région Terminale. MatP organise la région Terminale en un Macro Domaine en maintenant un certain degré de condensation (**Mercier 2008**). En l'absence de MatP, la ségrégation de la région Terminale intervient précocement dans le cycle cellulaire et l'ordre de ségrégation des *loci* dans la FHAR est perdu

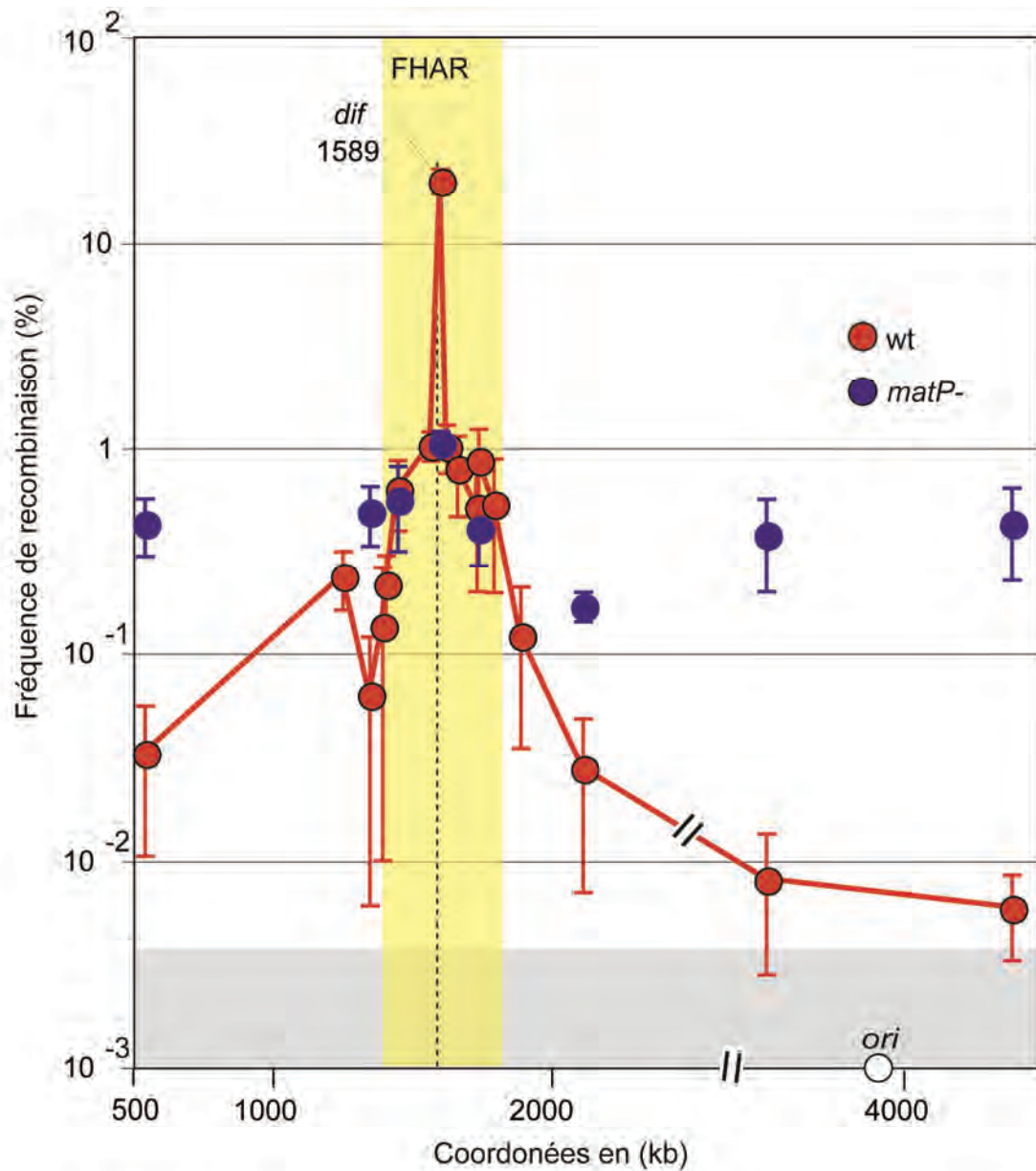


Figure 37 - MatP est impliquée dans la recombinaison au site *dif*

Mesure du pourcentage de recombinaison d'une cassette *dif-lacI-dif* insérée à différentes positions dans la région Terminale comme décrit **Figure 28**. Le taux de recombinaison a été mesuré dans la souche sauvage (Rouge) et *matP*⁻ (points bleus).

(Mercier 2008, Stouf 2013). Comme présenté **figure S6** (Stouf 2013), la concentration de site *matS* est plus importante dans la région assimilée à la FHAR. MatP organiserait donc préférentiellement la FHAR.

Nous avons étudié la dynamique du nucléoïde quand la région Terminale n'est plus organisée en un Macro Domaine (*matP*-) et quand l'occlusion du nucléoïde par SImA n'est plus présente (*slmA*-). Nos résultats montrent que le positionnement de la région Terminale via MatP, joue un rôle sur l'activité de SImA et qu'ainsi la dynamique de la région Terminale contrôle la division cellulaire.

3.1-MatP est requis pour la restriction de l'activité de FtsK dans la FHAR.

L'expérience ci-dessous a été réalisée par Carine Pagès.

Nous avons inséré à différentes positions de la région Terminale des cassettes de recombinaison *dif-lacI-dif* (**Figure 28A,B**) pour mesurer le taux de recombinaison médié par FtsK dans un contexte *matP*-. La recombinaison a été mesurée dans des souches $\Delta(dif)$, $\Delta(lacI)$ et $\Delta(xerC)$ avec une expression ectopique de XerC induite pour activer la recombinaison entre les deux sites *dif*. La perte du gène *lacI* induit la formation de colonies bleues en présence de X-Gal après étalement. Dans ces conditions, la quantité de colonies bleues a été mesurée pour chaque souche possédant une cassette *dif-lacI-dif* et représentée dans la souche sauvage en rouge et dans la souche *matP*- en bleu (**Figure 37**).

On remarque qu'en contexte *matP*-, la recombinaison au site *dif* est diminuée de plus de 10 fois, signifiant que MatP est nécessaire pour aider la recombinaison à *dif*. Quand MatP n'organise plus la région Terminale, 8% des cellules en condition rapide de croissance sont des filaments (Mercier 2008). Les filaments, dans un contexte *dif*- ou *xerC*-, correspondent aux dimères de chromosomes non résolus. On pourrait alors supposer que les filaments observés en *matP*-, correspondent à des dimères de chromosome non résolus. Cependant, quand les dimères de chromosomes ne sont pas résolus, le système SOS est induit (construction pSfiA-GFP). Or, en *matP*-, le système SOS n'est pas induit (Mercier 2008, **données du laboratoire**). L'observation d'une activité dépendante de MatP au niveau du site *dif* est en contradiction avec les données qui montrent que le système SOS n'est pas induit en *matP*-. La diminution de l'activité de recombinaison au niveau du site *dif* en *matP*- ne peut donc pas être corrélée avec la présence de filament dans ces conditions rapides de croissance.

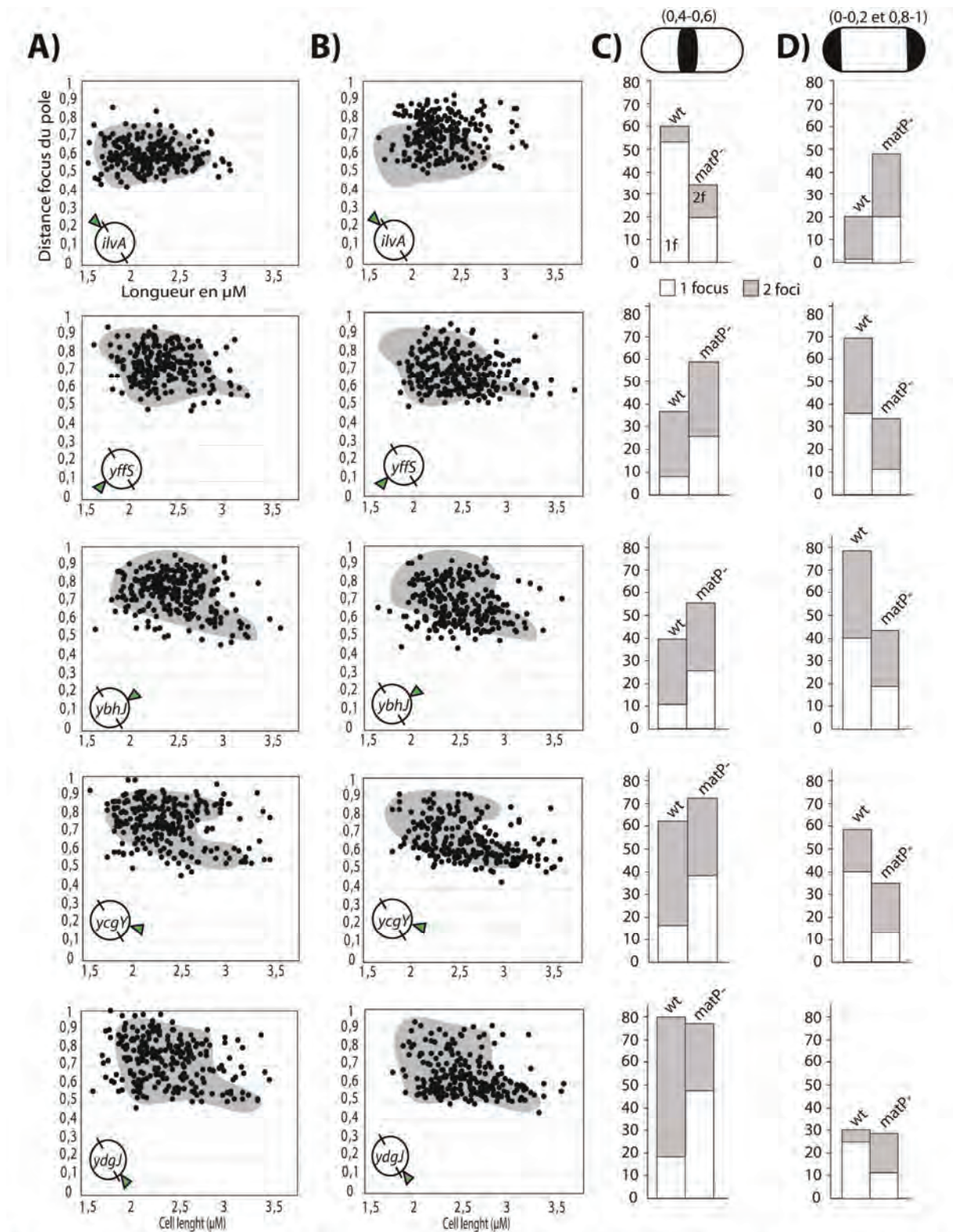


Figure 38 - La localisation de nombreux *loci* est altérée quand *MatP* n'organise plus la région Terminale.

(A) Localisation dans la longueur des cellules avec un *focus* pour un *locus* marqué dans la région Origine (*ilvA*), Left (*yffS*), Right (*ybhJ*), Terminale en dehors de la FHAR (*ycgY*) et dans la FHAR (*ydgJ*) dans la souche sauvage. (B) Idem qu'en A, mais dans la souche KOPSb avec en gris le profil de la souche sauvage pour comparaison. (C) Pourcentage de présence des *foci* au centre de la cellule des cellules avec un *focus* (blanc) et deux *foci* (gris) dans la souche sauvage et *matP*⁻. (D) Idem qu'en C, sauf que c'est la présence des *foci* aux pôles qui est représentée.

Cependant, dans des conditions lentes de croissance (**Figure S5, Stouf 2013**), nous observons dans une souche *xerC*⁻, au lieu de filaments, des cellules éclatées et morte quand les dimères de chromosomes ne sont pas résolus. Mais en *matP*⁻, nous n'observons pas ce type de cellules. Est-ce que la diminution de recombinaison au site *dif* peut être compensée par un cycle cellulaire plus lent ? Nous n'avons pas vérifié la présence du système SOS en *matP*⁻ en conditions lentes de croissance, de même que nous n'avons pas effectué le test de recombinaison (**Figure 37**) dans ces conditions. Ces expériences pourraient éclaircir le rôle de MatP dans la résolution des dimères de chromosomes au site *dif*.

Dans une souche où l'activité de FtsK n'est plus orientée dans la FHAR (**Figure 28**), on a remarqué que le pourcentage de recombinaison dans et en dehors de la FHAR est le même que dans la souche sauvage. On remarque ici que dans une souche *matP*⁻, la recombinaison en dehors de la position normale du site *dif* dans la FHAR, est la même que dans la souche sauvage, mais est différente en dehors de la FHAR (**Figure 37**). La présence de MatP pour l'efficacité de recombinaison, ne semble nécessaire dans la FHAR qu'au site *dif* et donc seulement pour la résolution des dimères de chromosome. Si ce résultat est surprenant puisqu'on s'attendrait à ce que la FHAR soit moins accessible à FtsK en *matP*⁻ comme décrit précédemment pour l'ordre de ségrégation des *loci*, il reste logique dans un modèle où un mécanisme autre que la présence de MatP localise la FHAR au centre la cellule, comme la présence de caténanes non résolus.

En dehors de la FHAR, le taux de recombinaison augmente en *matP*⁻ (**Figure 37**). On sait que MatP organise préférentiellement la FHAR (**Figure S7, Stouf 2013**) et que dans une souche *matP*⁻, la région Terminale est plus mobile (**Mercier 2008**). Notre hypothèse pour expliquer l'augmentation du taux de recombinaison en dehors de la FHAR est que dans une souche *matP*⁻, les *loci* en périphérie de la FHAR perdent leur localisation native. Ils peuvent alors être localisés à des régions différentes, donc aussi plus centrale dans la cellule, et ainsi être accessible à FtsK qui peut permettre la recombinaison de la cassette *dif-lacI-dif* plus souvent.

3.2-Le positionnement des *loci* en dehors de la FHAR est altéré quand la région Terminale n'est plus organisée.

MatP organise la région Terminale en un Macro Domaine et la perte de condensation en *matP*⁻ a été décrite précédemment (**Mercier 2008**). Dans un tel mutant, la région Terminale est ségrégée précocement. Nous nous sommes intéressé aux répercussions de la perte de condensation de la région Terminale sur la localisation des *loci* du reste du

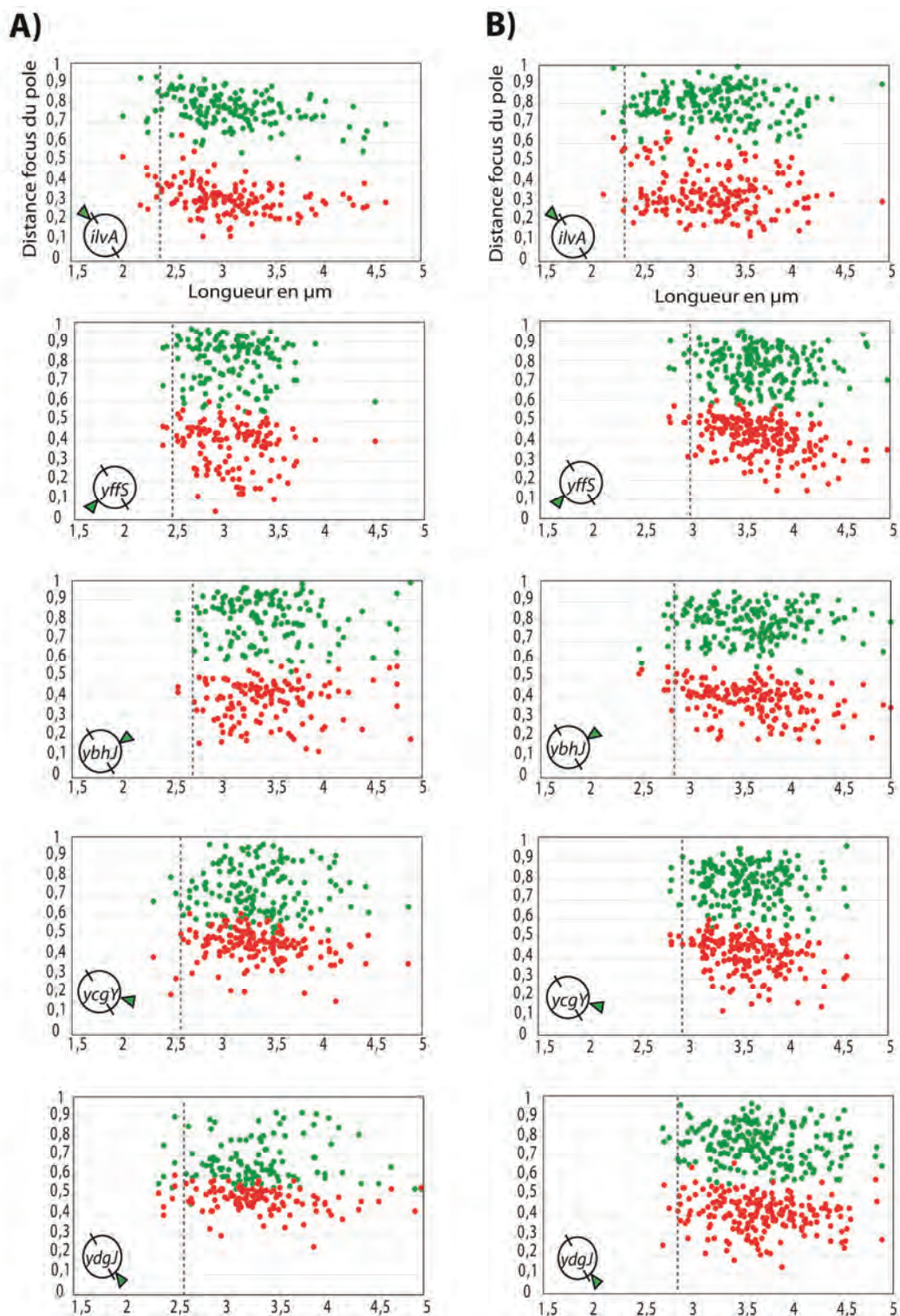


Figure 39-localisation des foci dans la longueur dans la souche sauvage et *matP*-

Localisation dans la longueur des cellules avec deux foci (après ségrégation) dans la souche sauvage (A) et *matP*- (B) pour des loci marqués dans la région Origine (*ilvA*), Left (*yffS*), Right (*ybhJ*), Terminale en dehors de la FHAR (*ycgY*) et dans la FHAR (*ydgJ*). Les traits en pointillés représentent le début de perte de co-localisation.

chromosome. Nous avons marqué des *loci* dans les différents Macro Domaine (Ori, Left et Right) et dans la région Terminale (en dehors de la FHAR et dans la FHAR). Nous avons observé leur localisation dans la longueur de la cellule (**Figure 38**).

Dans des conditions lentes de croissance où il n'y a pas de cycles répliatifs chevauchants (**Figure S1, Stouf 2013**), la mesure de la longueur de la cellule permet d'assimiler une taille de cellule donnée à une étape particulière du cycle cellulaire. La localisation d'un *focus* dans la longueur a été représentée en fonction de la longueur de la cellule rapportée à 1 (**Figure 38**). La position des *foci* pour les cellules avec 2 *foci* n'est pas représentée. La localisation des *foci* des souches sauvages et *matP*⁻ est différente (**Figure 38AB**). Pour un *locus* marqué dans la région Origine (*ilvA*), la localisation du *locus* est vers le centre de la cellule dans la souche sauvage (**Figure 38A,C**). En *matP*⁻, la localisation devient plus polaire (**Figure 38B,D**). Cette réorganisation est aussi observée pour les régions Left (*yffS*) et Right (*ybhJ*) où cette fois ci, la localisation de ces régions devient plus centrale. La région Terminale est celle qui dispose de la réorganisation centrale la plus significative.

Pour des *foci* ségrégués (**Figure 39**), le profil de ségrégation est moins précis pour tous les *foci* marqués (nuage de point moins dense en *matP*⁻). La ségrégation des *loci* de la région Origine diffère peu de la souche sauvage. Mais la ségrégation des autres régions du chromosome semble être plus tardive. Par exemple pour un *locus* marqué dans le MD gauche (Left), on observe que la ségrégation des *loci* est retardée de 2.5 μ M à 3 μ M (**Figure 39**).

Quand MatP n'organise plus la région Terminale, les *foci* de cette région, présents normalement au pôle en début de cycle cellulaire, sont maintenant localisés au centre de la cellule. L'organisation des autres régions du nucléoïde est alors perturbée. La ségrégation de la région Terminale ainsi que celles d'autres *loci* du nucléoïde est retardée. Le phénotype *matP*⁻ n'est donc pas réduit à la région Terminale comme décrit précédemment (**Mercier 2008**). L'organisation du nucléoïde Left→Ori/Ter→Right en début de cycle cellulaire changerait dans la *matP*⁻ et deviendrait alors Ori→Left/Right→Ter.

3.3-Mobilité des *loci* quand la région Terminale n'est plus condensée

Nous avons ensuite caractérisé les changements d'organisation du nucléoïde observés quand la région Terminale n'est plus organisée. Comme décrit précédemment (**Mercier 2008**), l'analyse de la MSD (Mean Square Displacement) permet de comparer la mobilité des *foci*. Nous avons donc mesuré à l'aide d'un plugin d'Image J (**View5D**), la mobilité des *foci* en x et y au cours d'une acquisition de 5 minutes (300 secondes) avec des images prises toutes les 5

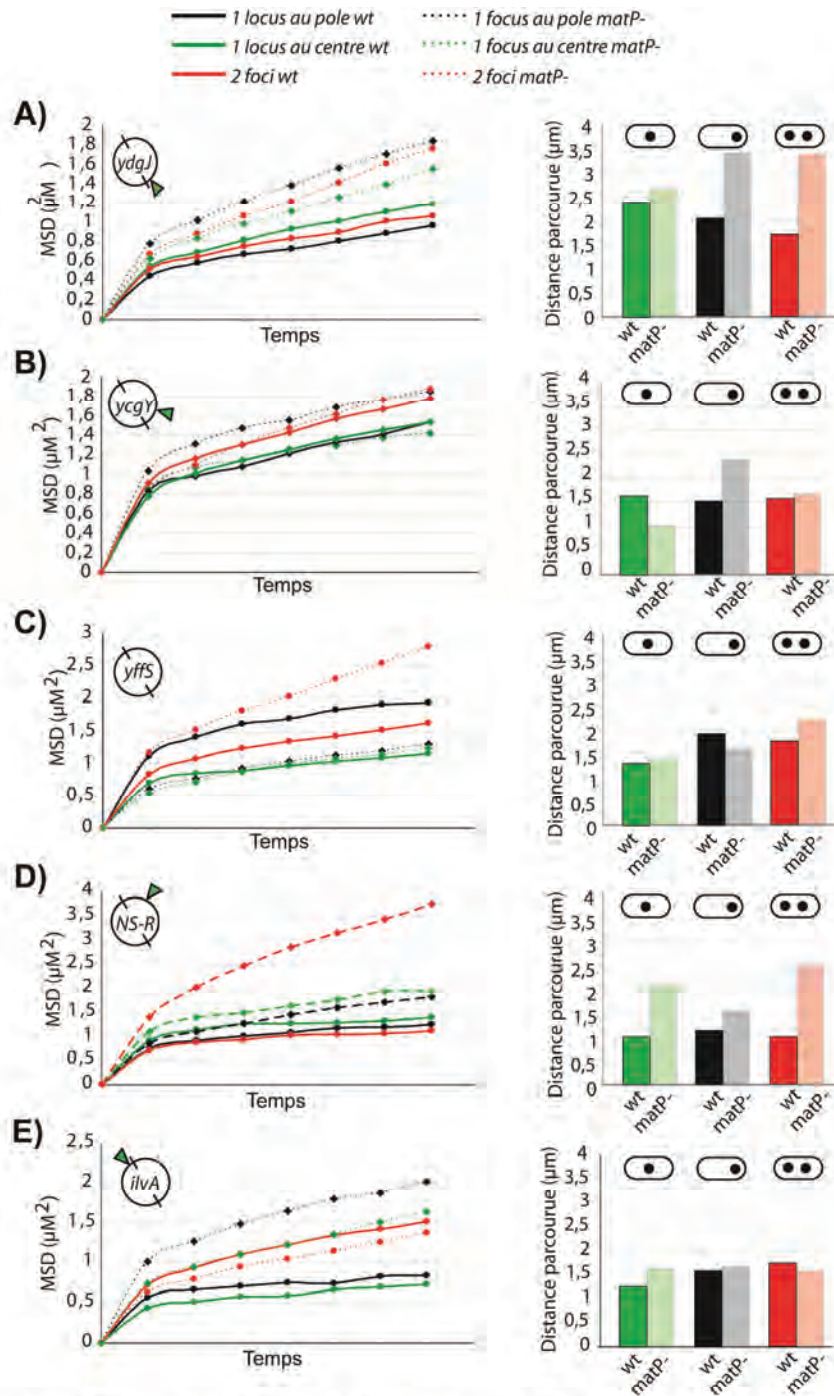


Figure 40 - Mobilité des *foci* dans la souche sauvage et *matP*⁻

Analyse de la mobilité de *foci* à différentes positions du chromosome ; dans la FHAR (A), dans la région Terminale mais en dehors de la FHAR (B), dans le MD Left (C), dans la région non structurée droite NS-R (D) et dans la région Origine (E). La mesure de la MSD est plotée en fonction de la durée de l'acquisition qui est de 300 secondes représentée en abscisse en stack de temps. La mesure de la mobilité des *foci* a été faite pour trois catégories de cellules, celles avec un *focus* au pôle (noir), celles avec un *focus* au centre (vert) et celles avec deux *foci* distincts (rouge), dans la souche sauvage en trait plein et *matP*⁻ en pointillé. La mesure de la distance parcourue est représentée pour chaque *locus* par des histogrammes pour la souche *matP*⁻ (en transparence) et pour la souche sauvage (sans transparence), pour les trois classes de cellules observées.

secondes. Nous avons regardé la mobilité de *loci* marqués dans les régions Origine, NS-R (non structurée droite), Left, en dehors de la FHAR et dans la FHAR.

Nous avons classé les cellules en trois catégories par rapport à leur position et le nombre de *foci* dans la cellule : les cellules avec un *focus* au centre de la cellule, avec un *focus* au pôle de la cellule, et les cellules avec deux *foci* visibles (distants sans quoi le logiciel d'analyse ne parvient pas à les distinguer). Répartir ces cellules en ces trois catégories, nous permet de séparer la mobilité d'un *focus*, avant et après ségrégation (cellules avec deux *foci* distincts). Dans le cas des observations de changement de localisation polaire et centrale (**Figure 38CD**), ces catégories nous permettent de caractériser la mobilité des *foci* à une étape plus précise du cycle cellulaire.

En *matP*⁻, la mobilité des *loci* dans la FHAR augmente quand le *locus* est au pôle de la cellule ou quand elle a été ségrégée, de même que la distance parcourue (**Figure 40A**). Quand la FHAR est au centre de la cellule, la mobilité des *foci* ainsi que la distance parcourue change peu. La mobilité des *foci* de la FHAR au centre de la cellule dépend donc d'un mécanisme autre que la condensation médiée par MatP, comme la présence des caténanes non résolues puisqu'une fois la FHAR ségrégée, la mobilité est augmentée en *matP*⁻. Quand le *locus* est au pôle et après ségrégation, la mobilité augmente en *matP*⁻, ainsi que la distance parcourue, ce qui est similaire aux données décrites précédemment (**Mercier 2008**).

En dehors de la FHAR (mais toujours dans la région Terminale) la mobilité des *foci* varie peu entre la souche sauvage et la *matP*⁻ : au centre pour les cellules avec deux *foci* ségrégés (trait vert et rouge) (**Figure 40B**). Quand le *locus* est localisé au pôle (trait noir pointillé) la mobilité est augmentée, comme la distance parcourue. MatP organisant préférentiellement la FHAR, la mobilité moindre, observée pour une localisation au centre et après ségrégation en *matP*⁻ pour un *locus* en dehors de cette région, est compréhensible.

Pour les *loci* marqués dans les régions Left et NS-R (non structurée droite), on remarque que la mobilité et distance parcourue par les *foci*, n'augmentent pas ou peu lorsque que les *loci* sont localisés au niveau du centre et au pôle (**Figure 40CD**). Cependant, la mobilité et distance parcourue augmentent significativement quand les *loci* ont été ségrégés (trait rouge en pointillé). Ces régions ont donc une mobilité qui dépend de la condensation de la région Terminale en un Macro Domaine.

Précédemment, nous avons observé que quand la région Terminale n'est plus condensée, la localisation d'un *locus* dans la région Origine, est polaire (**Figure 39**). La mobilité de ces *foci* au centre (trait vert pointillé) et au pôle (trait noir pointillé) augmente significativement dans la *matP*⁻ (**Figure 40E**). Mais, une fois les *loci* ségrégés (en rouge), la mobilité du *locus* marqué est la même dans la souche *matP*⁻ et sauvage. La région Origine possède une mobilité

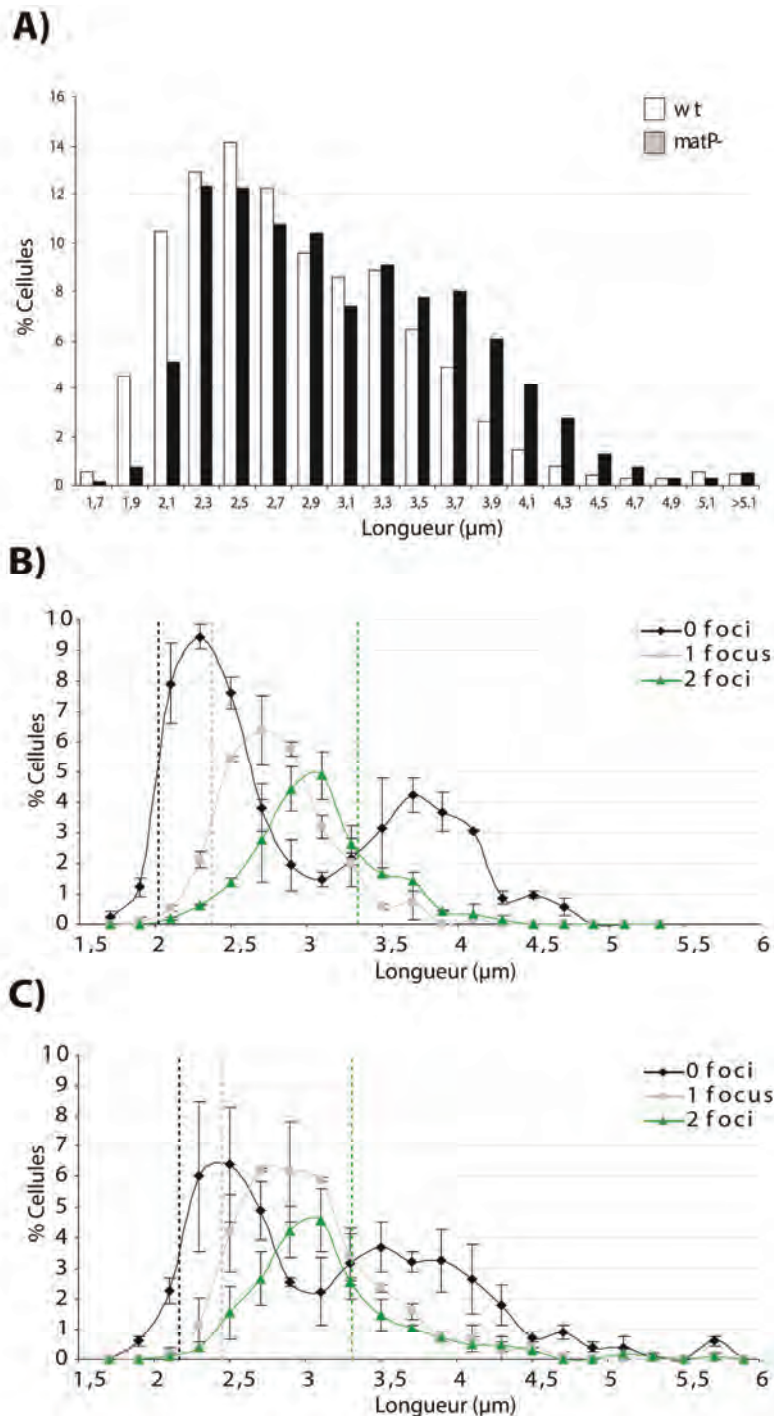


Figure 41- Longueur et cycle réplcatif dans la souche sauvage et *matP*⁻.

(A) Analyse de la longueur des cellules dans la souche sauvage (blanc) et *matP*⁻ (noir) de plus de 1500 cellules par souche. Représentation du cycle réplcatif dans la souche sauvage (B) et *matP*⁻ (C) possédant la fusion SSB-Yfp. Trois catégories de cellules ont été classées et représentées en fonction de la longueur des cellules : les cellules qui n'ont pas de réplcation en cours (sans *foci* de SSB, soit avant la réplcation, soit après), les cellules avec un *focus* réplcatif (cellules qui viennent d'initier et en fin de réplcation), et les cellules avec une réplcation en cours et deux *foci* pour chaque réplisome. Les traits en pointillés servent à illustrer les éventuelles différences entre les deux souches.

qui dépend de l'organisation de la région Terminale en début de cycle. Une fois ségrégée, sa mobilité retrouve sa normale. MatP, limite la mobilité des *foci* de la région FHAR et ceux de la région Origine en début de cycle cellulaire. Quand la FHAR est au centre de la cellule et quand le reste du chromosome a été ségrégé, seule la mobilité des régions Left, NS-R et de la FHAR est différente en *matP*- de la souche sauvage (cellules avec deux *foci*).

3.4-Rôle du timing de formation du septum de division dans la dynamique de la région Terminale.

La comparaison de la longueur des cellules dans la souche sauvage et *matP*-, en condition lente de croissance, indique que la perte d'organisation de la région Terminale a un impact sur le timing de division des cellules (**Figure 41A**). Dans ces conditions, la période répllicative a été observée et est précoce en *matP*- (**Figure 41BC**). Les études de la formation et localisation de l'anneau FtsZ via MicrobeTracker sont prévues par la construction d'une fusion ZapB-xfp (**Stoke 2012**). Ces analyses permettront de savoir pourquoi la division est retardée en *matP*- et de préciser quelle étape de la formation du divisome est retardée.

3.5-Organisation de la région Terminale au centre de la cellule

Comme précisé en introduction de cette partie, SlmA inhibe la formation des proto-filaments de FtsK quand il est lié à l'ADN. Les sites SBS complexés avec des dimères de SlmA sont localisés à proximité de gènes codant pour des protéines membranaires (**Tonthat 2013**). Or, par transertion ces gènes sont souvent localisés à la membrane ce qui permettrait à SlmA d'inhiber la formation des proto-filaments de FtsZ à cette membrane. La localisation de *loci* dans différentes régions du chromosome a été observée quand SlmA n'est plus capable d'inhiber la formation de ces proto-filaments (souche *slmA*-) (**Figure 42**). On remarque alors que seule la localisation d'un *locus* marqué dans la FHAR change dans la catégorie de cellules avec un *focus*. La ségrégation de la FHAR est retardée en *slmA*-. La ségrégation de *loci* dans cette région est aussi plus tardive (**Figure 43**). Aucun changement de localisation significatif des *loci* n'ont été observés en dehors de la FHAR avant et après ségrégation.

Ce retard de ségrégation de la FHAR par rapport à la souche sauvage correspond à un retard de division des cellules : la taille des cellules *slmA*- augmente par rapport à la souche sauvage (**Figure 44A**). Nous avons mesuré le nombre moyen de *foci* par cellule dans la souche sauvage, et *slmA*- pour savoir si le retard de ségrégation de la FHAR en *slmA*-, peut

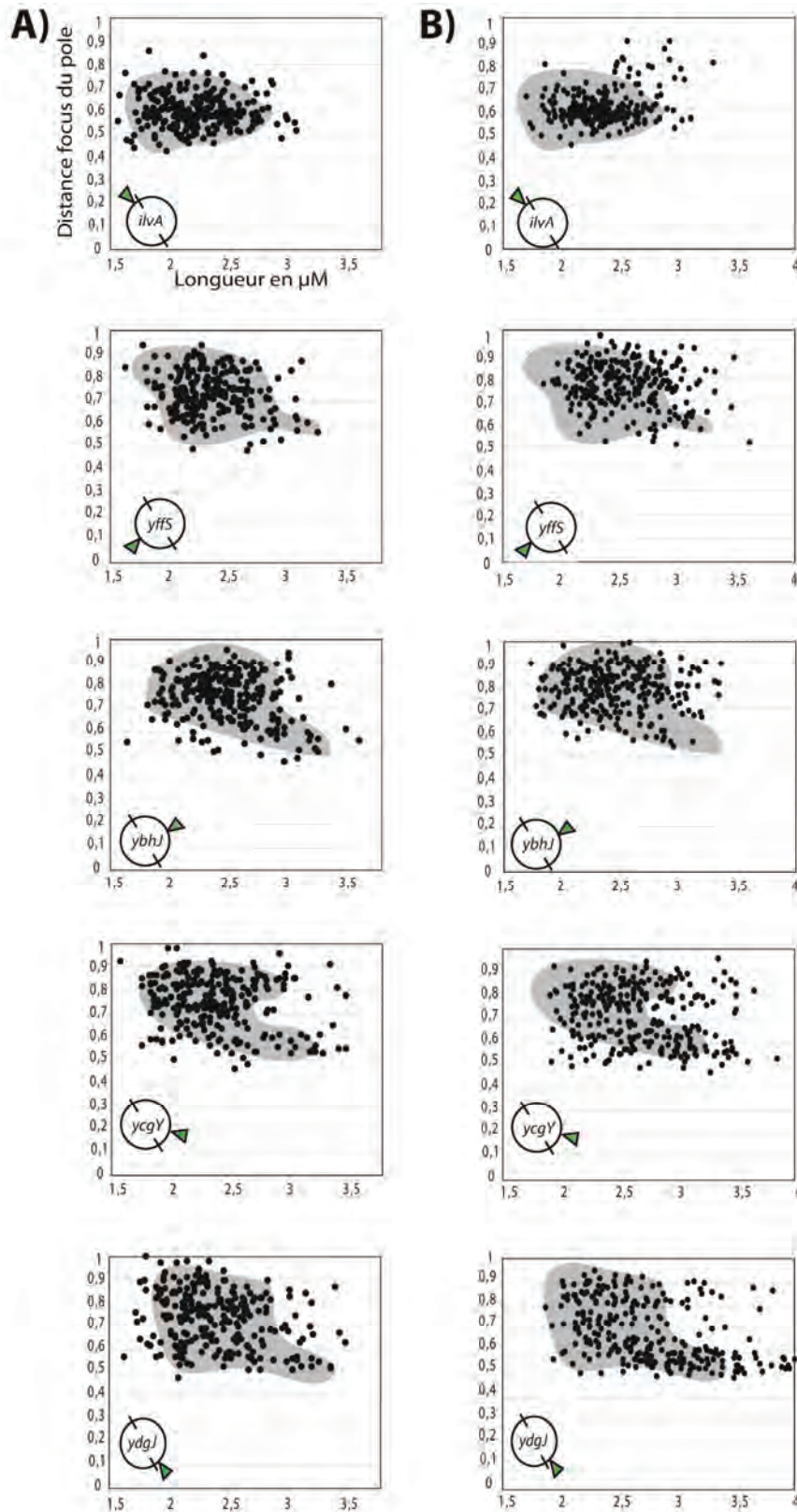


Figure 42 - Localisation de *foci* dans la souche sauvage et *slmA*-.

Représentation de la position des *foci* dans la longueur des cellules avec un *focus* (nuage de points noir) dans la souche sauvage (A) et *slmA*- (B) pour un *locus* marqué à différentes positions du chromosome, dans la région Origine (*ilvA*), Left (*yffS*), Right (*ybhJ*), Terminale en dehors de la FHAR (*ycgY*) et dans la FHAR (*ydgJ*). Le dessin en gris représente le profil de localisation des *loci* dans la souche sauvage.

être corrélé avec la présence de cycles réplicatifs chevauchants (**Figure 44B**). On remarque que le nombre moyen de *foci* par cellule augmente en *slmA*- pour des *loci* de plus en plus éloignés du site *dif*. La réplication en *slmA*- est plus précoce que dans la souche sauvage et des cellules disposants de trois *foci* apparaissent (**Figure 44CD**). Cependant comme expliqué partie 2.5.1, la construction SSB-Ypet semble avoir un effet épistatique sur l'augmentation de longueur des cellules observé en *slmA*- et limite l'interprétation des données sur les éventuelles différences de profil réplicatif.

Conclusion et Perspectives

Nos résultats montrent que l'organisation de la région Terminale, par sa condensation et sa localisation régule la dynamique du reste du nucléoïde. Dans une souche *matP*-, la recombinaison au site *dif* est diminuée de 10 fois et la recombinaison en dehors de la FHAR est augmentée de la même manière. Ces résultats montrent que la région Terminale doit être organisée en un MD pour faciliter la résolution des dimères de chromosome au site *dif* et uniquement au site *dif*. La localisation des régions autre que la FHAR est altérée quand MatP n'organise plus la région Terminale en un Macro Domaine. En début de cycle cellulaire la région Origine est localisée plus souvent au pôle qu'au centre de la cellule. Les régions Left, Right et surtout Terminale sont plus souvent localisées au centre de la cellule qu'au pôle. La localisation du nucléoïde en début de cycle décrite **Figure 27** et suivant une organisation Left→Right est perturbée en l'absence de MatP. En *matP*-, la ségrégation des *loci* est, en plus d'être retardée dans la région Terminale, retardée pour des *loci* marqués dans les régions Left et Right du chromosome. La perte d'organisation de la région Terminale en un MD en début de cycle cellulaire, se répercute ensuite sur la ségrégation des autres *loci* du chromosome, sauf pour la région Origine.

La mobilité des régions Origine et Terminale, en dehors de la FHAR, est augmentée en début de cycle cellulaire. Dès que la FHAR est localisée au centre de la cellule, c'est à dire quand les régions en dehors de la FHAR ont été ségréguées, la mobilité des *foci* en *matP*- est similaire à la souche sauvage pour la région Origine. Mais cette mobilité augmente significativement pour la région Non Structurée Droite et le MD Left. L'organisation de la région Terminale en un Macro Domaine dans nos conditions de croissance est nécessaire en début de cycle cellulaire pour l'organisation du nucléoïde selon l'orientation dans l'axe de la cellule Left→Right, et en toute fin de cycle cellulaire pour la résolution des dimères de chromosome.

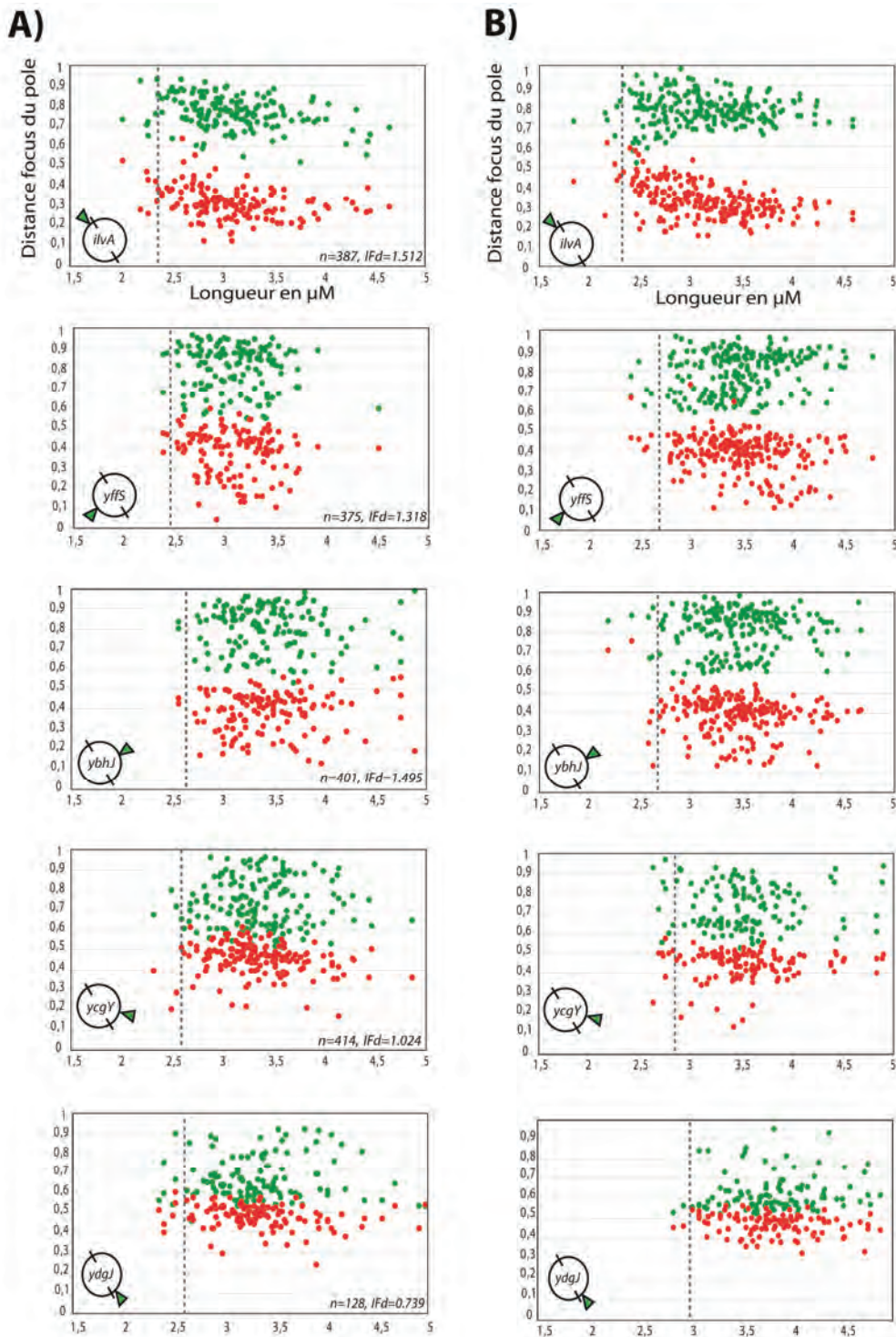


Figure 43 - Localisation des *foci* dans la longueur dans la souche sauvage et *slmA*-
 Localisation dans la longueur des cellules avec deux *foci* (perte de co-localisation) dans la souche sauvage (A) et *slmA*- (B) pour des *loci* marqués dans la région Origine (*ilvA*), Left (*yffS*), Right (*ybhJ*), Terminale en dehors de la FHAR (*ycgY*) et dans la FHAR (*ydgJ*). Les traits en pointillés représentent le début de perte de co-localisation.

La ségrégation de la région Terminale est retardée quand SlmA n'est plus présente. Ce retard de division pourrait avoir pour origine la formation de multiple site de septation précoce (proto-filament de FtsZ) à des positions où ils ne sont pas formés normalement. La septation est retardée dans ces conditions. Des expériences récentes effectuées par Elise Lebailly montrent que le défaut de division observé dans une souche *matP*⁻ est perdu quand on introduit la mutation *slmA*⁻. De même, dans une souche *zapB*⁻ et dans le double mutant *matP*⁻, *zapB*⁻, l'introduction du mutant *slmA*⁻ annule le retard de division observé. Ces données suggèrent fortement que le timing de mise en place du septum de division dans les mutants *matP*⁻ et *zapB*⁻ a pour origine l'activité de SlmA sur les proto-filaments de FtsZ.

Notre hypothèse est donc la suivante : quand MatP n'organise plus la région Terminale en un Macro Domaine ou quand la région Terminale n'est plus localisée préférentiellement au centre de la cellule par l'interaction entre ZapB et MatP, les *loci* en dehors de la région Terminale sont plus mobiles. Ces *loci* disposent de sites SBS et, en étant plus mobiles, ils peuvent alors être localisés plus souvent au centre de la cellule et retarder alors la formation de l'anneau FtsZ en fin de cycle cellulaire.

Si MatP est nécessaire en début de cycle pour organiser tout le nucléoïde, le retard de division observé dans une souche *matP*⁻, dépend uniquement de la probabilité d'un complexe SBS/SlmA devenu plus mobile pour inhiber la formation des proto-filaments de FtsZ au centre de la cellule en fin de cycle cellulaire.

Pour décrire d'avantage la dynamique de la région Terminale en fonction de la localisation de SlmA dans la cellule, la quantité de fluorescence dans une souche où SlmA a été fusionnée avec un fluorophore peut être mesurée. Dans des conditions rapides de croissance, SlmA localise au niveau de tout le nucléoïde (souche SlmA-eCFP). Mais dans des conditions lentes de croissance, SlmA possède une localisation diffuse dans la cellule. Regarder la localisation de SlmA au centre de la cellule en PALM (Photo-Activated Localization Microscopy) dans ces deux conditions de croissance, en fonction de la présence ou non d'un septum de division et dans une souche sauvage et *matP*⁻, nous permettrait de caractériser le rôle de SlmA dans le retard de division observé. Des souches possédant une fusion entre SlmA et un fluorophore photo-activable (DrompA et mEOS2) ont été construites, mais n'ont pas été encore analysées.

Le FRAP (Fluorescence Recovery After Photobleaching) peut aussi être utilisé pour décrire le rôle de SlmA dans l'inhibition de la formation de l'anneau Z en *matP*⁻. Dans une souche avec une fusion *slmA::xfp*, « frapper » la fluorescence au centre de la cellule et

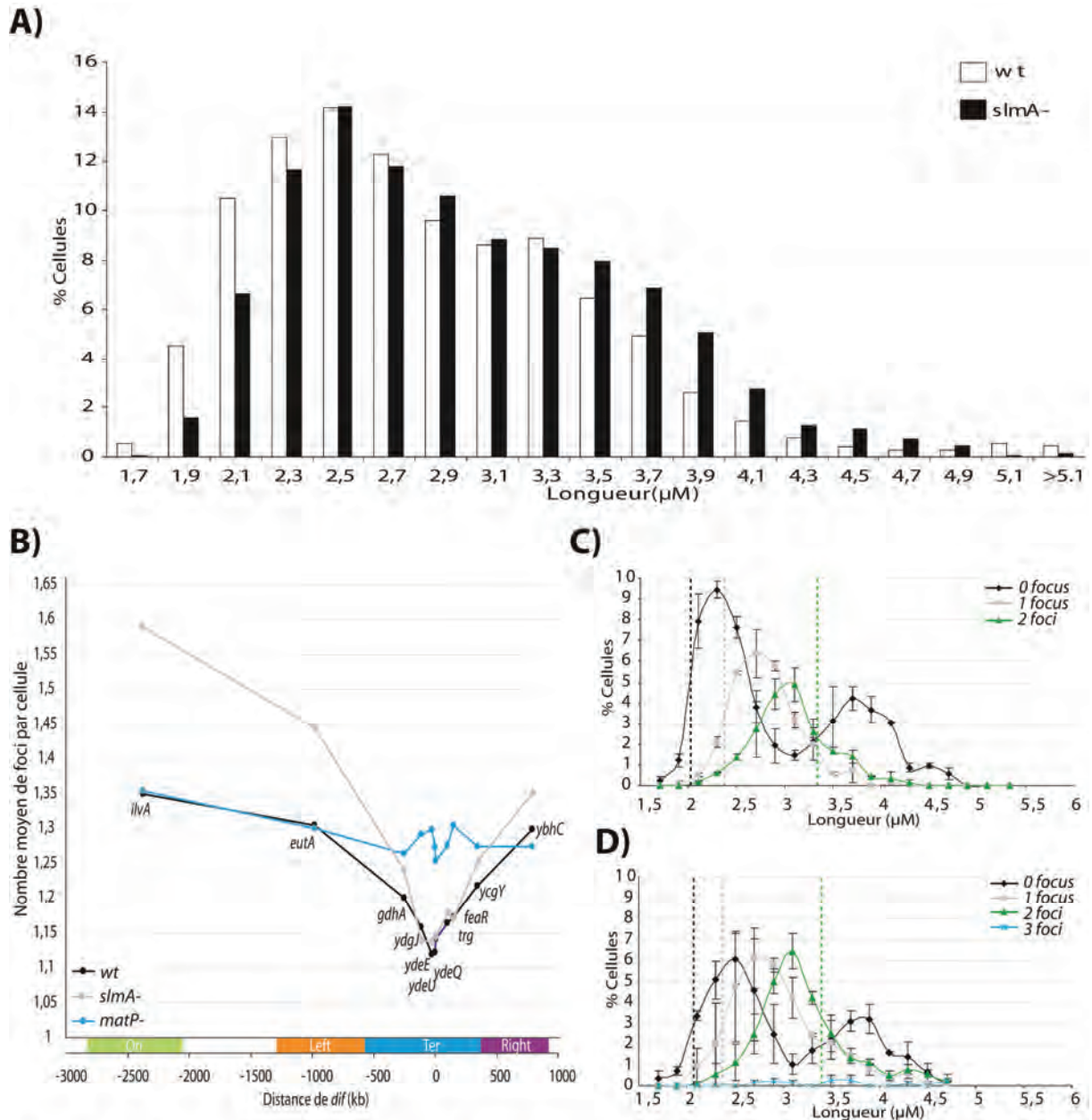


Figure 44 - Longueur, nombre moyen de foci et profil réplcatif en *slmA*⁻

(A) Représentation de la longueur des cellules dans la souche sauvage (blanc) et *slmA*⁻ (noir). **(B)** Nombre moyen de foci par cellule pour des *loci* marqués sur tous le chromosome dans la souche sauvage, *matP*⁻ et *slmA*⁻. Représentation du cycle réplcatif dans la souche sauvage **(C)** et *slmA*⁻ **(D)** possédant la fusion SSB-Yfp. Trois catégories de cellules ont été classées et représentée en fonction de la longueur des cellules : les cellules qui n'ont pas de réplcation en cours (sans foci de SSB, soit avant la réplcation, soit après), les cellules avec un focus réplcatif (cellules qui viennent d'initier oet en fin de réplcation), et les cellules avec une réplcation en cours et deux foci pour chaque réplisome. Les traits en pointillés servent pour bien illustrer les différences entre les deux souches.

regarder la récupération de fluorescence dans une souche sauvage et *matP*⁻, permettrait de savoir si en *matP*⁻, les *loci* qui portent des SBS sont plus mobiles que dans la souche sauvage. Cette expérience ne peut être concluante qu'en conditions rapides de croissance à cause de la localisation diffuse de SlmA dans la cellule en condition lente où la fluorescence en dehors du nucléoïde n'est pas distincte de la fluorescence propre au nucléoïde.

IV-Discussion générale : perspectives et questions ouvertes.

En commençant ma thèse dans l'équipe de François Cornet, peu de travaux sur l'étude, en microscopie à fluorescence, de la dynamique de *loci* dans la région Terminale (Li 2002, Kleckner 2005), et un seul sur la ségrégation de plus de trois *loci* dans la région Terminale avaient été publiés (Li 2003). Il avait été montré que la région Terminale est la dernière région à être ségrégée, qu'elle possède une période de cohésion étendue (période de cohésion en plus de celle commune à tous les *loci* néo-répliqués), et que la dynamique de la région Terminale migre du pôle au centre de la cellule. Ces résultats montraient que les *loci* dans la région Terminale se comportaient différemment des autres *loci* du chromosome. Ces résultats ont été obtenus avec des systèmes de marquage qui modifient la cohésion du *locus* marqué. Les outils disponibles pour analyser en microscopie la ségrégation de cette région, n'étaient pas assez sensibles pour décrire un quelconque ordre de ségrégation des *loci* dans cette région.

L'utilisation d'outils efficaces, dont les effets sur la cohésion du *locus* marqué sont contrôlés, a longtemps été un facteur limitant pour l'analyse de l'ordre de ségrégation des *loci* dans la région Terminale. De plus, cette région, comme décrit à plusieurs reprises précédemment, possède des propriétés qui font que sa ségrégation peut ne pas suivre l'ordre progressif de ségrégation des *loci* en dehors de la région Terminale. En effet, c'est dans la région Terminale que la réplication se termine et que par conséquent s'accumulent les caténanes. Dernièrement, il a d'ailleurs été montré que la cohésion entre *loci* a pour origine la présence de ces caténanes (Lesterlin 2012). L'activité de résolution de la Topoisomérase IV a longtemps été supposée comme étant un facteur clef dans la ségrégation des *loci* de la région Terminale, surtout dans l'hypothèse d'une activité préférentielle tardive de la Topo IV. Cependant, étudier l'activité de la TopoIV est complexe étant donné que les gènes *parC* et *parE* sont essentiels pour la survie de la cellule et qu'un changement d'expression comme une sur-expression de ces gènes, change drastiquement la physiologie de la cellule. Ces dernières années, la ségrégation de la région Terminale n'a été analysée que dans un cas : le cas particulier de formation des dimères de chromosomes. La résolution de ces dimères s'effectue au niveau du site *dif* dans 15% des cellules d'une population et est médiée par FtsK. FtsK est la seule translocase à ADN chez *E. coli* capable de ségréger l'ADN, et l'activité de translocation de FtsK n'a été montrée essentielle, que pour la résolution des dimères de chromosome. Les acteurs de la ségrégation de la région Terminale des monomères et le profil de ségrégation de cette région restaient donc à décrire.

La présence de systèmes Par chromosomiques chez les bactéries a longtemps laissé supposer que la force de ségrégation des chromosomes provenait de ces systèmes. Cependant, ces systèmes (hormis chez *C. crescentus*) ne sont essentiels que pour l'organisation et la

localisation des origines dans la cellule comme chez *V. cholerae*, *B. subtilis* et *P. aeruginosa*. Chez ces bactéries, le mécanisme qui conduit à la ségrégation du chromosome ne dépend pas uniquement des systèmes Par, mais très certainement de plusieurs mécanismes conservés chez toutes les bactéries.

C'est dans ce contexte que nous nous sommes intéressés à la compréhension de la ségrégation de la région Terminale. Décrire la ségrégation de cette région nous permettrait de mieux comprendre les forces et acteurs à l'origine de la ségrégation du chromosome.

1-FtsK ségrège de manière ordonnée et progressive la région Terminale.

La caractérisation de l'ordre de ségrégation de *loci* dans la région Terminale reposait sur l'utilisation et le choix des systèmes de marquage dont l'expression est contrôlée. L'utilisation du système FROS dans la région Terminale pouvait perturber les dernières étapes de la réplication à cause de la longueur des répétitions *tetO*, et ce système nécessite la présence d'anhydrotetracycline pour atténuer la liaison des répresseurs sur leur séquence opératrice. Nous avons décidé de ne pas utiliser ce système mais, de privilégier les systèmes ParB/*parS*. Cependant, même utilisés dans des conditions décrites comme neutres dans la littérature (sans induction), nous avons observé que ces systèmes augmentent la cohésion locale de *loci* marqué en maintenant plus longtemps deux *loci* répliqués ensemble. La résolution de ce problème et la mise en place d'un système dont l'expression des protéines ParB est contrôlée, a été une étape critique de ma thèse. De même, pour pouvoir comparer nos données avec celles des autres laboratoires et surtout être certains de l'analyse des données, nous avons dû changer les conditions de croissance. La caractérisation du cycle cellulaire nous a permis d'analyser et de comprendre le profil de ségrégation de la région Terminale.

1.1-Discussion des résultats

Nos résultats montrent que la ségrégation du chromosome d'*E. coli* est précise et peut se diviser en trois grandes étapes : dans un premiers temps la région Origine est ségrégée. Puis, dans une même fenêtre de temps, les régions Left, Right et Terminale (hors FHAR) sont ségrégées. Enfin, la région FHAR est ségrégée. Par la suite, nous avons montré qu'une région à proximité du site *dif* dispose d'une ségrégation ordonnée et progressive de manière à ce que les *loci* les plus éloignés du site *dif* soient ségrégés en premier. Nos résultats montrent que la

région autour du site *dif* (10 kb) est la dernière région de contact entre les deux chromosomes frères. La supposition que le site *dif* soit le dernier à être ségrégué, a pour origine la résolution des dimères de chromosome à ce site. Mais cette supposition n'a été émise que pour des dimères de chromosome. Nous avons montré que la ségrégation de tous les chromosomes (monomère et dimères) se termine au niveau du site *dif*.

L'information principale de nos travaux est que la translocase à ADN FtsK est responsable du maintien de l'ordre de ségrégation de la FHAR. Quand FtsK n'est plus orientée sur le chromosome, l'ordre de ségrégation dans la région Terminale est perdu (nul ou altéré). De plus, l'ordre de ségrégation des *loci* dans la FHAR dépend de la présence de MatP et donc, de l'organisation de la région Terminale en un Macro-Domaine et, de sa présence au centre de la cellule par l'interaction MatP/ZapB. Notre hypothèse est que l'activité de translocation par FtsK n'est essentielle que pour maintenir un ordre de ségrégation ordonné et progressif. La rupture des interactions MatP/MatP et / ou MatP/ZapB, par la force de translocation de FtsK, est le mécanisme qui permet de conserver l'ordre de réplication des *loci*. Chez les bactéries disposant de site KOPS, *matS* et un site *dif*, l'ordre de ségrégation des *loci* devrait suivre le même profil que chez *E. coli*.

Nous suggérons que la région Terminale n'est pas organisée de la même manière en dehors et dans la FHAR. La concentration en *matS* (Figure S6, **Stouf 2013**) dans la FHAR est plus importante qu'en dehors. De ce fait, la condensation par MatP serait plus dense dans la FHAR qu'en dehors. Pour comprendre l'ordre de ségrégation des *loci* médié par FtsK, il faut s'imaginer la région Terminale comme une région organisée avec un cœur très condensé assimilé à la FHAR et des *loci* périphériques moins organisés en dehors de la FHAR. FtsK en transloquant l'ADN romperait les premières interactions MatP/MatP et/ou MatP/ZapB en périphérie de la région Terminale. Les *loci* en dehors de la FHAR resteraient moins longtemps au centre de la cellule que les *loci* dans la FHAR. Une fois la FHAR accessible à FtsK, l'activité de translocation de FtsK est plus forte car les *loci* de cette région restent plus longtemps au centre. L'interaction de FtsK avec la FHAR ne dépend pas des KOPS (**Deghorain 2011**). Se posent donc deux questions pour comprendre l'origine de l'activité préférentielle de FtsK dans la FHAR : (i) Est-ce que c'est parce que la FHAR reste le plus longtemps au centre de la cellule ? (ii) Ou est ce que c'est parce que FtsK est plus proche physiquement de la FHAR que du reste de la région Terminale grâce à un diamètre septal plus court ? (en supposant que le diamètre du septum quand les *loci* en dehors de la FHAR ont été ségrégués, soit plus grand que celui lors de la ségrégation des *loci* de la FHAR).

ZapB maintient la région Ter au centre de la cellule. Il est intéressant de se demander avec quels *loci* ZapB interagit préférentiellement ? Est-ce que ce sont les *loci* dans la FHAR ou les *loci* en dehors ? Au début de la ségrégation de la région Terminale, on peut penser que ZapB interagit préférentiellement avec les MatP liés à des *loci* en dehors de la FHAR, qui sont les moins organisés, et donc les plus disponibles en périphérie du nucléoïde. Quand il ne reste que la FHAR à ségréger au centre de la cellule, et en tenant compte de la présence plus importante de *matS* dans cette région : comment interagit MatP avec ZapB ? On ignore quel est le degré de compétition entre la tétramérisation de MatP et l'interaction MatP_{dimérique} avec ZapB_{dimérique}.

Ces questions visent à comprendre : (i) l'origine de l'activité préférentielle de FtsK dans la FHAR, (ii) le rôle de l'organisation de cette région par MatP et, (iii) l'orientation de FtsK sur l'ADN dans le maintien de l'ordre de ségrégation progressif des *loci* de cette région en direction du site *dif*.

1.2-Hypothèse sur les forces à l'origine de la ségrégation de la région Terminale

FtsK est une pompe à ADN : en transloquant, elle enlève temporairement les protéines fixées sur l'ADN. Quand la région Terminale est maintenue au centre de la cellule par l'interaction ZapB/MatP, la ségrégation de la région peut être expliquée par la capacité de FtsK à nettoyer l'ADN. FtsK ne tirerait pas l'ADN pour l'entraîner en dehors de la zone septale de la cellule, mais le nettoierait pour permettre à d'autres types de forces de prendre le relai sur la ségrégation des *loci* nettoyés (temporairement puisque les protéines s'y refixent par la suite). Ces forces pourraient être d'origine entropique ou via la présence d'attaches comme décrit en fin de la deuxième partie de l'introduction (**Jun and Wright 2010, Fisher 2013**). La concentration des sites *matS* dans la FHAR suggère que la région Terminale est plus condensée au centre qu'en périphérie par un effet cumulatif des interactions MatP/MatP. La présence de KOPS, en plus grande quantité dans la FHAR qu'en dehors peut être corrélée avec cette concentration de *matS* : FtsK serait plus active dans la FHAR pour nettoyer plus facilement et plus souvent cette région, afin de décondenser le chromosome plus facilement pour faciliter la ségrégation.

Le linker de FtsK est 5 fois plus grand que celui de SpoIIIE, or, il a été montré que SpoIIIE peut étendre son linker jusqu'à 50nm du septum de la pré-spore (**Fiche 2013**). FtsK pourrait ainsi transloquer l'ADN dans une région de 250nm de chaque côté du septum (soit en fin de cycle pour une cellule de 4µm, 12,5% de l'espace cellulaire). On peut supposer alors que, de l'extension du septum peut dépendre l'activité de FtsK selon, comme précisée plus

haut, l'hypothèse que l'activité de FtsK dans la FHAR dépendrait de sa capacité à interagir plus longtemps avec la FHAR qu'avec les autres *loci*.

Quelle est alors la zone réelle d'activité subcellulaire de FtsK ? On peut facilement imaginer qu'un tel linker permet au domaine C-Ter de transloquer (nettoyer) efficacement tous les *loci* au centre de la cellule, et que la longueur du linker a justement été conservée évolutivement pour cette activité.

1.3-Perspectives expérimentales

Dans mes travaux, je me limite à une région de 200kb autour du site *dif* et l'assimile à la FHAR. Or, la FHAR s'étend sur plus de 400kb. Cette analogie est faite volontairement puisque je pense qu'il n'est pas nécessaire de construire des souches avec des *loci* entre les 200 et 400 kb de ces deux régions et d'étudier l'ordre de ségrégation de ces *loci*. Mais, j'aurai aimé disposer de plus de temps pour préciser d'avantage la ségrégation de ces *loci*. En effet, il se peut que, comme pour les SNAPs, certains *loci* de la région Terminale disposent d'un retard de ségrégation. L'accumulation de liens d'intercaténation dans cette région provient peut être de ces retards de ségrégation.

Pour décrire plus précisément le profil de ségrégation de la FHAR, j'avais commencé à analyser en temps réel la ségrégation de souches avec deux *loci* différents marqués. Cependant, dans les conditions de croissance lente utilisées (M9 Alanine 30°C), les cellules sont très photo sensibles et j'ai observé plusieurs fois un arrêt de croissance au-delà de 5h en time lapse. Le temps de génération en M9 Alanine 30°C étant de 3,5 heures (210 minutes), je n'ai donc pas pu observer la formation de colonies dans ces conditions. J'ai testé différentes méthodes pour résoudre ce problème de croissance, notamment au niveau du montage de mes échantillons (dépôt d'un ml de milieu-agar, utilisation de carré hermétique, sillage du milieu-agar pour augmenter la concentration en oxygène) ou des paramètres de microscopie (sensibilité de la caméra), en vain. En conditions plus rapides de croissance (M9 Glycerol 30 +/- CSA), je n'ai observé aucun problème en time lapse (même sur une période de plus de 12 heures). Mon hypothèse est donc que la concentration de la source carbonée est le facteur limitant pour effectuer un Time-Lapse de plus de 5 heures en croissance lente de mes souches. Cependant, je n'ai pas eu l'occasion de tester une augmentation de concentration en Alanine (supérieure à 0,2%) pour vérifier cette hypothèse.

Une question à laquelle je n'ai pas répondu durant ces analyses mais qui nous aurait aidé à préciser la période de cohésion étendue de la FHAR aurait été de connaître la durée individuelle et réelle de co-localisation après réplication des *loci* testés en microscopie. Jusqu'à présent, le pourcentage de cellule à un *focus* (des *loci* non répliqués, répliqués et jusqu'à ce qu'ils soient ségrégués), mesuré est assimilé à la cohésion relative d'un *locus*. Je pense qu'il est possible de visualiser et mesurer simplement la période de co-localisation réelle d'un *locus* en microscopie. Mon idée repose sur la quantité minimale de répétition *tetO* nécessaire pour observer un *locus* en microscopie. Si on insère une longueur de répétition *tetO* qui doit être de 70-100 répétitions (à la limite de visualisation d'un *focus*), alors quand le *locus* n'est pas répliqué, on ne devrait pas voir le signal fluorescent à un *locus* précis. Dès que ce *locus* est répliqué et que les deux copies sont cohésives, les deux *loci* devraient permettre la visualisation d'un *focus* puisqu'on double la quantité de répétition *tetO* locale. Dans mes analyses précédentes, j'utilisais environ 250 répétitions *tetO* ; construire des souches avec 125, 100 et 75 répétitions *tetO* insérées à certains *loci* dans la région Terminale permettrait de suivre l'apparition des *foci* marquant la cohésion.

2- La dynamique de la région Terminale contrôle la fin du cycle cellulaire.

Nous avons montré que la dynamique de la région Terminale au cours du cycle, affecte la dynamique de tout le nucléoïde. Le retard de division observé quand MatP n'organise plus cette région, a pour origine la mobilité plus importante des *loci* dans les régions Left et NS-R. Ces régions possèdent des SBS, qui inhibent après liaison de dimères de SlmA, la formation de l'anneau Z au centre de la cellule. Quand ces régions sont plus mobiles en fin de cycle cellulaire, elles peuvent localiser plus souvent au centre de la cellule et retarder la mise en place du septum de division.

Nous avons montré que l'organisation de la région Terminale en un Macro Domaine par MatP augmente le taux de recombinaison au site *dif*. Cependant, les tests de recombinaison génétique et les analyses microscopiques n'ont pas été réalisés dans les mêmes conditions de croissance, lesquelles modifient la dynamique de la région Terminale. Peut-on corrélérer, l'effet de la présence MatP sur la recombinaison au site *dif* (**Figure 37**) avec, la perte de mobilité des *loci* de la FHAR mesurée par MSD et observé en microscopie à fluorescence ? Il faudrait, pour être certain que cette corrélation existe, analyser le pourcentage de recombinaison en condition lente de croissance.

Pour préciser l'importance de MatP dans la recombinaison à *dif*, il serait intéressant de regarder si c'est la condensation en tétramères de MatP (mesure du taux de recombinaison

dans un mutant MatP incapable de former des tétramères) ou la localisation médiée via l'interaction de MatP avec ZapB qui est responsable de cette perte de recombinaison (mesure du taux de recombinaison en *zapB*-). La délétion progressive de sites *matS*, de l'extérieur en direction du site *dif*, et du site *dif* en direction de l'extérieur du MD Ter, dans deux séries de souches, et la mesure du pourcentage de recombinaison des *loci* dans chaque souche, permettraient de comprendre plus précisément le rôle de MatP dans l'efficacité de recombinaison au site *dif*. Est-ce que seuls les deux sites *matS* dans le voisinage du site *dif* (sites positionnés à 1561 kb et 1598 kb, site *dif* à 1588kb) sont suffisants pour avoir une recombinaison efficace au site *dif*? Ou est-ce que c'est la perte d'organisation de toute la région Terminale ou de la FHAR en un MD qui est responsable de la perte de recombinaison au site *dif*?

L'analyse de la mobilité des *foci* ainsi que de leur localisation et ordre de ségrégation dans une souche *zapB*- permettrait de savoir si la perte de localisation préférentielle de la FHAR, au centre de la cellule, peut altérer la mobilité des *foci* en dehors de cette région. La région Terminale possède une localisation subcellulaire préférentiellement en périphérie du nucléoïde tout au long du cycle. La localisation de la région Terminale au centre de la cellule en fin de cycle semble être restreinte à la périphérie du nucléoïde (Meile 2011). Or, la réplication peut se faire aussi en périphérie du nucléoïde comme chez *B. subtilis* (Berlitzky 2008). Comment s'organise la région Terminale quand elle est progressivement répliquée ?

Quand la région Terminale est répliquée, elle reste au centre de la cellule et interagit avec le septum de division via l'interaction ZapB/MatP. Mais quand ZapB n'est pas encore présente au septum une fois la réplication terminée en conditions lente de croissance, comment s'organisent les *loci* dans la région Terminale ? Répondre à cette question nous permettrait de savoir si, pendant la période post répliquative et avant que le septum ne soit formé, la région Terminale est organisée de la même manière que quand le septum est formé. Analyser la localisation de *loci*, en fonction de la présence ou non d'un septum quand la région Terminale est au centre, dans le petit axe de la cellule, nous permettrait de savoir si par exemple, la FHAR possède une localisation périphérique ou centrale. Timer la ségrégation des *loci* de la région Terminale et leur localisation dans des souches possédant un marqueur précoce du divisome comme ZapB ou ZapA, nous permettrait de préciser d'avantage la dynamique spatio-temporelle de la région Terminale en fin de cycle cellulaire.

3-Cohésion et topologie terminale

La cohésion de la région Terminale a deux sources : une cohésion post-réplivative commune à tous les *loci* répliqués, et une cohésion étendue. Il a été montré que dans un mutant *matP*⁻, les interactions entre chromosomes frères sont maintenues dans la région Terminale suggérant que MatP n'est pas le seul responsable de la cohésion post réplivative de cette région (**Lesterlin 2012**). En fin de réplication les pré-caténanes non résolus deviennent des caténanes qui pourraient maintenir les deux régions terminales cohésives.

La résolution de la cohésion de la région Terminale intervient tardivement. Si l'activité de la Topoisomérase IV est continue tout au long du cycle, la cohésion de la région Terminale devrait être perdue rapidement après la fin de la réplication. Or, ce n'est pas le cas. Il y a donc deux hypothèses : soit l'activité de la TopoIV est régulée temporellement après la fin de la réplication, soit un très grand nombre de caténanes sont formés en fin de réplication dans la région Terminale ce qui retarderait leur résolution. La deuxième hypothèse est la plus probable puisqu'il faudrait une période longue pour résoudre tous ces liens en fin de cycle et que cette résolution soit progressive de l'Origine vers le site *dif*. Il a d'ailleurs été observé *in vitro*, que le site *dif* est le site où l'activité de la Topoisomérase IV est la plus élevée et que l'activité de FtsK modulerait celle de la Topoisomérase IV (**Bigot 2010**).

De plus, l'activité de translocation de FtsK au site *dif* change la topologie de cette région (**Saleh 2004**). Nous ignorons toujours comment sont gérés ces stress topologiques en fin de cycle. De même du timing de la résolution des dimères de chromosome par rapport à la résolution des liens d'inter-caténation. On ignore aussi l'origine de la cohésion étendue dans la région Terminale. De nombreuses questions sur la topologie en fin de cycle cellulaire sont encore sans réponses.

Une sous partie de mes travaux de thèse avait pour objectif de construire des souches où l'activité de la Topoisomérase IV (gènes *parC* et *parE*) pouvait être contrôlée de manière très précise. Dans les différents travaux où l'activité de la TopoIV a été modulée *in vivo*, un plasmide sur-exprimant la Topo IV, dans un contexte où les *loci* sauvages des gènes *parC* et *parE* n'ont pas été altérés, a été utilisé. Notre objectif était de construire une souche avec le gène *parC/parE* ou un opéron *parC-parE* au locus *araB* et/ou *lacZ*, puis d'induire l'expression de l'une, l'autre ou les deux sous unités à une certaine période du cycle cellulaire dans une population synchronisée. Pour caractériser précisément le rôle de la TopoIV, la suppression, dans de telles souches, des *loci* sauvages des gènes *parC* et/ou *parE* nous aurait permis de sous exprimer la Topo IV. Trouver des conditions optimales d'inductions similaires

à la souche sauvage sera une étape cruciale pour permettre de caractériser le rôle de la TopoIV dans la ségrégation des *loci* dans la région Terminale.

V-Références

- Adachi, S., T. Fukushima & S. Hiraga, (2008) Dynamic events of sister chromosomes in the cell cycle of *Escherichia coli*. *Genes Cells* **13**: 181-197.
- Adams, D.W. & J. Errington, (2009) Bacterial cell division: assembly, maintenance and disassembly of the Z ring. *Nat Rev Microbiol* **7**: 642-653.
- Alyahya, S.A., R. Alexander, T. Costa, A.O. Henriques, T. Emonet & C. Jacobs-Wagner, (2009) RodZ, a component of the bacterial core morphogenic apparatus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**: 1239-1244.
- Aussel, L., F.X. Barre, M. Aroyo, A. Stasiak, A.Z. Stasiak & D. Sherratt, (2002) FtsK Is a DNA motor protein that activates chromosome dimer resolution by switching the catalytic state of the XerC and XerD recombinases. *Cell* **108**: 195-205.
- Badrinarayanan, A., R. Reyes-Lamothe, S. Uphoff, M.C. Leake & D.J. Sherratt, (2012) In vivo architecture and action of bacterial structural maintenance of chromosome proteins. *Science* **338**: 528-531.
- Barre, F.X., (2007) FtsK and SpoIIIE: the tale of the conserved tails. *Mol Microbiol* **66**: 1051-1055.
- Barre, F.X., M. Aroyo, S.D. Colloms, A. Helfrich, F. Cornet & D.J. Sherratt, (2000) FtsK functions in the processing of a Holliday junction intermediate during bacterial chromosome segregation. *Genes Dev* **14**: 2976-2988.
- Bates, D., J. Epstein, E. Boye, K. Fahrner, H. Berg & N. Kleckner, (2005) The *Escherichia coli* baby cell column: a novel cell synchronization method provides new insight into the bacterial cell cycle. *Mol Microbiol* **57**: 380-391.
- Bates, D. & N. Kleckner, (2005) Chromosome and replisome dynamics in *E. coli*: loss of sister cohesion triggers global chromosome movement and mediates chromosome segregation. *Cell* **121**: 899-911.
- Begg, K.J., S.J. Dewar & W.D. Donachie, (1995) A new *Escherichia coli* cell division gene, *ftsK*. *J Bacteriol* **177**: 6211-6222.
- Ben-Yehuda, S., M. Fujita, X.S. Liu, B. Gorbatyuk, D. Skoko, J. Yan, J.F. Marko, J.S. Liu, P. Eichenberger, D.Z. Rudner & R. Losick, (2005) Defining a centromere-like element in *Bacillus subtilis* by Identifying the binding sites for the chromosome-anchoring protein RacA. *Mol Cell* **17**: 773-782.
- Ben-Yehuda, S., D.Z. Rudner & R. Losick, (2003) Assembly of the SpoIIIE DNA translocase depends on chromosome trapping in *Bacillus subtilis*. *Curr Biol* **13**: 2196-2200.
- Berlatzky, I.A., A. Rouvinski & S. Ben-Yehuda, (2008) Spatial organization of a replicating bacterial chromosome. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**: 14136-14140.
- Bernhardt, T.G. & P.A. de Boer, (2005) SlmA, a nucleoid-associated, FtsZ binding protein required for blocking septal ring assembly over Chromosomes in *E. coli*. *Mol Cell* **18**: 555-564.
- Bernstein, J.A., A.B. Khodursky, P.H. Lin, S. Lin-Chao & S.N. Cohen, (2002) Global analysis of mRNA decay and abundance in *Escherichia coli* at single-gene resolution using two-color fluorescent DNA microarrays. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 9697-9702.
- Bhat, M.A., A.V. Philp, D.M. Glover & H.J. Bellen, (1996) Chromatid segregation at anaphase requires the barren product, a novel chromosome-associated protein that interacts with Topoisomerase II. *Cell* **87**: 1103-1114.
- Bigot, S., J. Corre, J.M. Louarn, F. Cornet & F.X. Barre, (2004) FtsK activities in Xer recombination, DNA mobilization and cell division involve overlapping and separate domains of the protein. *Mol Microbiol* **54**: 876-886.
- Bigot, S., O.A. Saleh, F. Cornet, J.F. Allemand & F.X. Barre, (2006) Oriented loading of FtsK on KOPS. *Nat Struct Mol Biol* **13**: 1026-1028.
- Bigot, S., O.A. Saleh, C. Lesterlin, C. Pages, M. El Karoui, C. Dennis, M. Grigoriev, J.F. Allemand, F.X. Barre & F. Cornet, (2005) KOPS: DNA motifs that control *E. coli* chromosome segregation by orienting the FtsK translocase. *EMBO J* **24**: 3770-3780.

- Bigot, S., V. Sivanathan, C. Possoz, F.X. Barre & F. Cornet, (2007) FtsK, a literate chromosome segregation machine. *Mol Microbiol* **64**: 1434-1441.
- Bird, R.E., J. Louarn, J. Martuscelli & L. Caro, (1972) Origin and sequence of chromosome replication in *Escherichia coli*. *J Mol Biol* **70**: 549-566.
- Blakely, G., S. Colloms, G. May, M. Burke & D. Sherratt, (1991) *Escherichia coli* XerC recombinase is required for chromosomal segregation at cell division. *New Biol* **3**: 789-798.
- Blakely, G., G. May, R. McCulloch, L.K. Arciszewska, M. Burke, S.T. Lovett & D.J. Sherratt, (1993) Two related recombinases are required for site-specific recombination at *dif* and *cer* in *E. coli* K12. *Cell* **75**: 351-361.
- Blakely, G.W. & D.J. Sherratt, (1994) Interactions of the site-specific recombinases XerC and XerD with the recombination site *dif*. *Nucleic Acids Res* **22**: 5613-5620.
- Blattner, F.R., G. Plunkett, C.A. Bloch, N.T. Perna, V. Burland, M. Riley, J. Collado-Vides, J.D. Glasner, C.K. Rode, G.F. Mayhew, J. Gregor, N.W. Davis, H.A. Kirkpatrick, M.A. Goeden, D.J. Rose, B. Mau & Y. Shao, (1997) The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science* **277**: 1453-1462.
- Bloomfield, V.A., (1997) DNA condensation by multivalent cations. *Biopolymers* **44**: 269-282.
- Bowman, G.R., L.R. Comolli, J. Zhu, M. Eckart, M. Koenig, K.H. Downing, W.E. Moerner, T. Earnest & L. Shapiro, (2008) A polymeric protein anchors the chromosomal origin/ParB complex at a bacterial cell pole. *Cell* **134**: 945-955.
- Boyle, D.S., D. Grant, G.C. Draper & W.D. Donachie, (2000) All major regions of FtsK are required for resolution of chromosome dimers. *J Bacteriol* **182**: 4124-4127.
- Breier, A.M. & N.R. Cozzarelli, (2004) Linear ordering and dynamic segregation of the bacterial chromosome. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 9175-9176.
- Breier, A.M. & A.D. Grossman, (2007) Whole-genome analysis of the chromosome partitioning and sporulation protein Spo0J (ParB) reveals spreading and origin-distal sites on the *Bacillus subtilis* chromosome. *Mol Microbiol* **64**: 703-718.
- Browning, D.F., D.C. Grainger & S.J. Busby, (2010) Effects of nucleoid-associated proteins on bacterial chromosome structure and gene expression. *Curr Opin Microbiol* **13**: 773-780.
- Buenemann, M. & P. Lenz, (2010) A geometrical model for DNA organization in bacteria. *PLoS One* **5**: e13806.
- Capiaux, H., F. Cornet, J. Corre, M.I. Guijo, K. Pérals, J.E. Rebollo & J.M. Louarn, (2001) Polarization of the *Escherichia coli* chromosome. A view from the terminus. *Biochimie* **83**: 161-170.
- Capiaux, H., J.C. Giard, S. Lemarinier & Y. Auffray, (2000) Characterization and analysis of a new gene involved in glucose starvation response in *Enterococcus faecalis*. *Int J Food Microbiol* **55**: 99-102.
- Capiaux, H., C. Lesterlin, K. Pérals, J.M. Louarn & F. Cornet, (2002) A dual role for the FtsK protein in *Escherichia coli* chromosome segregation. *EMBO Rep* **3**: 532-536.
- Carl, P.L., (1970) *Escherichia coli* mutants with temperature-sensitive synthesis of DNA. *Mol Gen Genet* **109**: 107-122.
- Chastanet, A. & R. Carballido-Lopez, (2012) The actin-like MreB proteins in *Bacillus subtilis*: a new turn. *Front Biosci (Schol Ed)* **4**: 1582-1606.
- Chattoraj, D.K., (1980) Dimeric intermediates of recombination in phage lambda. *Cell* **19**: 143-149.
- Cho, H. & T.G. Bernhardt, (2013) Identification of the SlmA active site responsible for blocking bacterial cytokinetic ring assembly over the chromosome. *PLoS Genet* **9**: e1003304.
- Cho, H., H.R. McManus, S.L. Dove & T.G. Bernhardt, (2011) Nucleoid occlusion factor SlmA is a DNA-activated FtsZ polymerization antagonist. *Proc Natl Acad Sci U S A*

- 108**: 3773-3778.
- Clerget, M., (1991) Site-specific recombination promoted by a short DNA segment of plasmid R1 and by a homologous segment in the terminus region of the *Escherichia coli* chromosome. *New Biol* **3**: 780-788.
- Cornet, F., K. Anselme, T. Grard, M. Rouahi, B. Noël, P. Hardouin & J. Jeanfils, (2002) The influence of culture conditions on extracellular matrix proteins synthesized by osteoblasts derived from rabbit bone marrow. *J Biomed Mater Res* **63**: 400-407.
- Cornet, F., O. Broux, K. Anselme, P. Hardouin & J. Jeanfils, (2004) Effect of dexamethasone on moesin gene expression in rabbit bone marrow stromal cells. *Mol Cell Biochem* **265**: 79-83.
- Cornet, F., B. Hallet & D.J. Sherratt, (1997) Xer recombination in *Escherichia coli*. Site-specific DNA topoisomerase activity of the XerC and XerD recombinases. *J Biol Chem* **272**: 21927-21931.
- Cornet, F. & J.I. Illana, (1996) tau⁻ pair production via photon-photon collisions at the CERN e⁺e⁻ collider LEP. *Phys Rev D Part Fields* **53**: 1181-1184.
- Cornet, F., J.I. Illana & M. Masip, (2001) TeV strings and the neutrino-nucleon cross section at ultrahigh energies. *Phys Rev Lett* **86**: 4235-4238.
- Cornet, F., J. Louarn, J. Patte & J.M. Louarn, (1996) Restriction of the activity of the recombination site dif to a small zone of the *Escherichia coli* chromosome. *Genes Dev* **10**: 1152-1161.
- Cornet, F., I. Mortier, J. Patte & J.M. Louarn, (1994) Plasmid pSC101 harbors a recombination site, psi, which is able to resolve plasmid multimers and to substitute for the analogous chromosomal *Escherichia coli* site dif. *J Bacteriol* **176**: 3188-3195.
- Crozat, E. & I. Grainge, (2010) FtsK DNA translocase: the fast motor that knows where it's going. *Chembiochem* **11**: 2232-2243.
- Crozat, E., A. Meglio, J.F. Allemand, C.E. Chivers, M. Howarth, C. Vénien-Bryan, I. Grainge & D.J. Sherratt, (2010a) Separating speed and ability to displace roadblocks during DNA translocation by FtsK. *EMBO J* **29**: 1423-1433.
- Crozat, E., A. Meglio, J.F. Allemand, C.E. Chivers, M. Howarth, C. Vénien-Bryan, I. Grainge & D.J. Sherratt, (2010b) Separating speed and ability to displace roadblocks during DNA translocation by FtsK. *EMBO J* **29**: 1423-1433.
- Cui, T., N. Moro-oka, K. Ohsumi, K. Kodama, T. Ohshima, N. Ogasawara, H. Mori, B. Wanner, H. Niki & T. Horiuchi, (2007) *Escherichia coli* with a linear genome. *EMBO Rep* **8**: 181-187.
- Dame, R.T., O.J. Kalmykova & D.C. Grainger, (2011a) Chromosomal macrodomains and associated proteins: implications for DNA organization and replication in gram negative bacteria. *PLoS Genet* **7**: e1002123.
- Dame, R.T., M. Tark-Dame & H. Schiessel, (2011b) A physical approach to segregation and folding of the *Caulobacter crescentus* genome. *Mol Microbiol* **82**: 1311-1315.
- Danilova, O., R. Reyes-Lamothe, M. Pinskaya, D. Sherratt & C. Possoz, (2007) MukB colocalizes with the oriC region and is required for organization of the two *Escherichia coli* chromosome arms into separate cell halves. *Mol Microbiol* **65**: 1485-1492.
- Datsenko, K.A. & B.L. Wanner, (2000) One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 6640-6645.
- de Boer, P.A., R.E. Crossley & L.I. Rothfield, (1989) A division inhibitor and a topological specificity factor coded for by the minicell locus determine proper placement of the division septum in *E. coli*. *Cell* **56**: 641-649.
- de Massy, B., S. Béjar, J. Louarn, J.M. Louarn & J.P. Bouché, (1987) Inhibition of replication forks exiting the terminus region of the *Escherichia coli* chromosome occurs at two loci separated by 5 min. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**: 1759-1763.
- de Vries, R., (2010) DNA condensation in bacteria: Interplay between macromolecular

- crowding and nucleoid proteins. *Biochimie* **92**: 1715-1721.
- Deghorain, M., C. Pagès, J.C. Meile, M. Stouf, H. Capioux, R. Mercier, C. Lesterlin, B. Hallet & F. Cornet, (2011) A defined terminal region of the E. coli chromosome shows late segregation and high FtsK activity. *PLoS One* **6**: e22164.
- Dekker, J., K. Rippe, M. Dekker & N. Kleckner, (2002) Capturing chromosome conformation. *Science* **295**: 1306-1311.
- Diez, A.A., A. Farewell, U. Nannmark & T. Nyström, (1997) A mutation in the ftsK gene of Escherichia coli affects cell-cell separation, stationary-phase survival, stress adaptation, and expression of the gene encoding the stress protein UspA. *J Bacteriol* **179**: 5878-5883.
- Dingman, C.W., (1974) Bidirectional chromosome replication: some topological considerations. *J Theor Biol* **43**: 187-195.
- Donachie, W.D., (1968) Relationship between cell size and time of initiation of DNA replication. *Nature* **219**: 1077-1079.
- Dorman, C.J., (2004) H-NS: a universal regulator for a dynamic genome. *Nat Rev Microbiol* **2**: 391-400.
- Draper, G.C., N. McLennan, K. Begg, M. Masters & W.D. Donachie, (1998) Only the N-terminal domain of FtsK functions in cell division. *J Bacteriol* **180**: 4621-4627.
- Dubarry, N., F. Pasta & D. Lane, (2006) ParABS systems of the four replicons of Burkholderia cenocepacia: new chromosome centromeres confer partition specificity. *J Bacteriol* **188**: 1489-1496.
- Dubarry, N., C. Possoz & F.X. Barre, (2010) Multiple regions along the Escherichia coli FtsK protein are implicated in cell division. *Mol Microbiol* **78**: 1088-1100.
- Duggin, I.G., R.G. Wake, S.D. Bell & T.M. Hill, (2008) The replication fork trap and termination of chromosome replication. *Mol Microbiol* **70**: 1323-1333.
- Dupaigne, P., N.K. Tonthat, O. Espéli, T. Whitfill, F. Boccard & M.A. Schumacher, (2012) Molecular basis for a protein-mediated DNA-bridging mechanism that functions in condensation of the E. coli chromosome. *Mol Cell* **48**: 560-571.
- Dworkin, J. & R. Losick, (2002) Does RNA polymerase help drive chromosome segregation in bacteria? *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 14089-14094.
- Ebersbach, G., A. Briegel, G.J. Jensen & C. Jacobs-Wagner, (2008) A self-associating protein critical for chromosome attachment, division, and polar organization in caulobacter. *Cell* **134**: 956-968.
- Ebersbach, G., S. Ringgaard, J. Møller-Jensen, Q. Wang, D.J. Sherratt & K. Gerdes, (2006) Regular cellular distribution of plasmids by oscillating and filament-forming ParA ATPase of plasmid pB171. *Mol Microbiol* **61**: 1428-1442.
- Erickson, H.P., D.W. Taylor, K.A. Taylor & D. Bramhill, (1996) Bacterial cell division protein FtsZ assembles into protofilament sheets and minirings, structural homologs of tubulin polymers. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 519-523.
- Espeli, O., C. Lee & K.J. Mariani, (2003a) A physical and functional interaction between Escherichia coli FtsK and topoisomerase IV. *J Biol Chem* **278**: 44639-44644.
- Espeli, O., C. Levine, H. Hassing & K.J. Mariani, (2003b) Temporal regulation of topoisomerase IV activity in E. coli. *Mol Cell* **11**: 189-201.
- Espeli, O., R. Mercier & F. Boccard, (2008) DNA dynamics vary according to macrodomain topography in the E. coli chromosome. *Mol Microbiol* **68**: 1418-1427.
- Espéli, O., R. Borne, P. Dupaigne, A. Thiel, E. Gigant, R. Mercier & F. Boccard, (2012) A MatP-divisome interaction coordinates chromosome segregation with cell division in E. coli. *EMBO J* **31**: 3198-3211.
- Fekete, R.A. & D.K. Chattoraj, (2005) A cis-acting sequence involved in chromosome segregation in Escherichia coli. *Mol Microbiol* **55**: 175-183.
- Fiebig, A., K. Keren & J.A. Theriot, (2006) Fine-scale time-lapse analysis of the biphasic, dynamic behaviour of the two Vibrio cholerae chromosomes. *Mol Microbiol* **60**: 1164-

- 1178.
- Fisher, J.K., A. Bourniquel, G. Witz, B. Weiner, M. Prentiss & N. Kleckner, (2013) Four-dimensional imaging of *E. coli* nucleoid organization and dynamics in living cells. *Cell* **153**: 882-895.
- Fletcher, D.A. & R.D. Mullins, (2010) Cell mechanics and the cytoskeleton. *Nature* **463**: 485-492.
- Formstone, A. & J. Errington, (2005) A magnesium-dependent mreB null mutant: implications for the role of mreB in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* **55**: 1646-1657.
- François, V., J. Louarn & J.M. Louarn, (1989) The terminus of the *Escherichia coli* chromosome is flanked by several polar replication pause sites. *Mol Microbiol* **3**: 995-1002.
- Fujimitsu, K., T. Senriuchi & T. Katayama, (2009) Specific genomic sequences of *E. coli* promote replicational initiation by directly reactivating ADP-DnaA. *Genes Dev* **23**: 1221-1233.
- Galli, E. & K. Gerdes, (2012) FtsZ-ZapA-ZapB interactome of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **194**: 292-302.
- Garner, E.C., R. Bernard, W. Wang, X. Zhuang, D.Z. Rudner & T. Mitchison, (2011) Coupled, circumferential motions of the cell wall synthesis machinery and MreB filaments in *B. subtilis*. *Science* **333**: 222-225.
- Geissler, B. & W. Margolin, (2005) Evidence for functional overlap among multiple bacterial cell division proteins: compensating for the loss of FtsK. *Mol Microbiol* **58**: 596-612.
- Gerdes, K., M. Howard & F. Szardenings, (2010) Pushing and pulling in prokaryotic DNA segregation. *Cell* **141**: 927-942.
- Gerdes, K., J. Møller-Jensen & R. Bugge Jensen, (2000) Plasmid and chromosome partitioning: surprises from phylogeny. *Mol Microbiol* **37**: 455-466.
- Goehring, N.W., C. Robichon & J. Beckwith, (2007) Role for the nonessential N terminus of FtsN in divisome assembly. *J Bacteriol* **189**: 646-649.
- Gordon, G.S., D. Sitnikov, C.D. Webb, A. Teleman, A. Straight, R. Losick, A.W. Murray & A. Wright, (1997) Chromosome and low copy plasmid segregation in *E. coli*: visual evidence for distinct mechanisms. *Cell* **90**: 1113-1121.
- Graham, J.E., D.J. Sherratt & M.D. Szczelkun, (2010a) Sequence-specific assembly of FtsK hexamers establishes directional translocation on DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**: 20263-20268.
- Graham, J.E., V. Sivanathan, D.J. Sherratt & L.K. Arciszewska, (2010b) FtsK translocation on DNA stops at XerCD-dif. *Nucleic Acids Res* **38**: 72-81.
- Grainge, I., M. Bregu, M. Vazquez, V. Sivanathan, S.C. Ip & D.J. Sherratt, (2007) Unlinking chromosome catenanes in vivo by site-specific recombination. *EMBO J* **26**: 4228-4238.
- Grainge, I., C. Lesterlin & D.J. Sherratt, (2011) Activation of XerCD-dif recombination by the FtsK DNA translocase. *Nucleic Acids Res* **39**: 5140-5148.
- Grant, R.A., D.J. Filman, S.E. Finkel, R. Kolter & J.M. Hogle, (1998) The crystal structure of Dps, a ferritin homolog that binds and protects DNA. *Nat Struct Biol* **5**: 294-303.
- Graumann, P.L., R. Losick & A.V. Strunnikov, (1998) Subcellular localization of *Bacillus subtilis* SMC, a protein involved in chromosome condensation and segregation. *J Bacteriol* **180**: 5749-5755.
- Hale, C.A., H. Meinhardt & P.A. de Boer, (2001) Dynamic localization cycle of the cell division regulator MinE in *Escherichia coli*. *EMBO J* **20**: 1563-1572.
- Hayama, R. & K.J. Mariani, (2010) Physical and functional interaction between the condensin MukB and the decatenase topoisomerase IV in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**: 18826-18831.
- HELMSTETTER, C.E. & D.J. CUMMINGS, (1963) BACTERIAL SYNCHRONIZATION BY SELECTION OF CELLS AT DIVISION. *Proc Natl Acad Sci U S A* **50**: 767-774.

- Hendricks, E.C., H. Szerlong, T. Hill & P. Kuempel, (2000) Cell division, guillotining of dimer chromosomes and SOS induction in resolution mutants (dif, xerC and xerD) of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **36**: 973-981.
- Hendrickson, H. & J.G. Lawrence, (2006) Selection for chromosome architecture in bacteria. *J Mol Evol* **62**: 615-629.
- Hiasa, H. & K.J. Marians, (1992) Differential inhibition of the DNA translocation and DNA unwinding activities of DNA helicases by the *Escherichia coli* Tus protein. *J Biol Chem* **267**: 11379-11385.
- Hiasa, H. & K.J. Marians, (1994) Tus prevents overreplication of oriC plasmid DNA. *J Biol Chem* **269**: 26959-26968.
- Higgins, N.P., (2007) Mutational bias suggests that replication termination occurs near the dif site, not at Ter sites: what's the Dif? *Mol Microbiol* **64**: 1-4.
- Higgins, N.P., X. Yang, Q. Fu & J.R. Roth, (1996) Surveying a supercoil domain by using the gamma delta resolution system in *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol* **178**: 2825-2835.
- Hill, T.M., J.M. Henson & P.L. Kuempel, (1987) The terminus region of the *Escherichia coli* chromosome contains two separate *loci* that exhibit polar inhibition of replication. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**: 1754-1758.
- Hill, T.M., M.L. Tecklenburg, A.J. Pelletier & P.L. Kuempel, (1989) *tus*, the trans-acting gene required for termination of DNA replication in *Escherichia coli*, encodes a DNA-binding protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**: 1593-1597.
- Hillebrand, A., R. Wurm, A. Menzel & R. Wagner, (2005) The seven *E. coli* ribosomal RNA operon upstream regulatory regions differ in structure and transcription factor binding efficiencies. *Biol Chem* **386**: 523-534.
- Hiraga, S., (2000) Dynamic localization of bacterial and plasmid chromosomes. *Annu Rev Genet* **34**: 21-59.
- Hiraga, S., H. Niki, R. Imamura, T. Ogura, K. Yamanaka, J. Feng, B. Ezaki & A. Jaffé, (1991) Mutants defective in chromosome partitioning in *E. coli*. *Res Microbiol* **142**: 189-194.
- Hiraga, S., H. Niki, T. Ogura, C. Ichinose, H. Mori, B. Ezaki & A. Jaffé, (1989) Chromosome partitioning in *Escherichia coli*: novel mutants producing anucleate cells. *J Bacteriol* **171**: 1496-1505.
- Hirota, Y., J. Mordoh & F. Jacob, (1970) On the process of cellular division in *Escherichia coli*. 3. Thermosensitive mutants of *Escherichia coli* altered in the process of DNA initiation. *J Mol Biol* **53**: 369-387.
- Hirvonen, C.A., W. Ross, C.E. Wozniak, E. Marasco, J.R. Anthony, S.E. Aiyar, V.H. Newburn & R.L. Gourse, (2001) Contributions of UP elements and the transcription factor FIS to expression from the seven *rrn* P1 promoters in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **183**: 6305-6314.
- Hojgaard, A., H. Szerlong, C. Tabor & P. Kuempel, (1999) Norfloxacin-induced DNA cleavage occurs at the dif resolvase *locus* in *Escherichia coli* and is the result of interaction with topoisomerase IV. *Mol Microbiol* **33**: 1027-1036.
- Hommais, F., E. Krin, C. Laurent-Winter, O. Soutourina, A. Malpertuy, J.P. Le Caer, A. Danchin & P. Bertin, (2001) Large-scale monitoring of pleiotropic regulation of gene expression by the prokaryotic nucleoid-associated protein, H-NS. *Mol Microbiol* **40**: 20-36.
- Hu, Z. & J. Lutkenhaus, (2001) Topological regulation of cell division in *E. coli*. spatiotemporal oscillation of MinD requires stimulation of its ATPase by MinE and phospholipid. *Mol Cell* **7**: 1337-1343.
- Iismaa, T.P. & R.G. Wake, (1987) The normal replication terminus of the *Bacillus subtilis* chromosome, *terC*, is dispensable for vegetative growth and sporulation. *J Mol Biol* **195**: 299-310.

- Ip, S.C., M. Bregu, F.X. Barre & D.J. Sherratt, (2003) Decatenation of DNA circles by FtsK-dependent Xer site-specific recombination. *EMBO J* **22**: 6399-6407.
- Ireton, K., N.W. Gunther & A.D. Grossman, (1994) spo0J is required for normal chromosome segregation as well as the initiation of sporulation in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **176**: 5320-5329.
- JACOB, F. & S. BRENNER, (1963) [On the regulation of DNA synthesis in bacteria: the hypothesis of the replicon]. *C R Hebd Seances Acad Sci* **256**: 298-300.
- Jensen, R.B., S.C. Wang & L. Shapiro, (2001) A moving DNA replication factory in *Caulobacter crescentus*. *EMBO J* **20**: 4952-4963.
- Jin, D.J. & J.E. Cabrera, (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.
- Joshi, M.C., A. Bourniquel, J. Fisher, B.T. Ho, D. Magnan, N. Kleckner & D. Bates, (2011) *Escherichia coli* sister chromosome separation includes an abrupt global transition with concomitant release of late-splitting intersister snaps. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**: 2765-2770.
- Jun, S. & B. Mulder, (2006) Entropy-driven spatial organization of highly confined polymers: lessons for the bacterial chromosome. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 12388-12393.
- Jun, S. & A. Wright, (2010) Entropy as the driver of chromosome segregation. *Nat Rev Microbiol* **8**: 600-607.
- Kang, S., J.S. Han, J.H. Park, K. Skarstad & D.S. Hwang, (2003) SeqA protein stimulates the relaxing and decatenating activities of topoisomerase IV. *J Biol Chem* **278**: 48779-48785.
- Kantor, G.J. & R.A. Deering, (1968) Effect of nalidixic acid and hydroxyurea on division ability of *Escherichia coli* fil⁺ and lon⁻ strains. *J Bacteriol* **95**: 520-530.
- Kavenoff, R. & O.A. Ryder, (1976) Electron microscopy of membrane-associated folded chromosomes of *Escherichia coli*. *Chromosoma* **55**: 13-25.
- Keane, O.M. & C.J. Dorman, (2003) The gyr genes of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium are repressed by the factor for inversion stimulation, Fis. *Mol Genet Genomics* **270**: 56-65.
- Kennedy, S.P., F. Chevalier & F.X. Barre, (2008) Delayed activation of Xer recombination at dif by FtsK during septum assembly in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **68**: 1018-1028.
- Keyamura, K., Y. Abe, M. Higashi, T. Ueda & T. Katayama, (2009) DiaA dynamics are coupled with changes in initial origin complexes leading to helicase loading. *J Biol Chem* **284**: 25038-25050.
- Kono, N., K. Arakawa & M. Tomita, (2011) Comprehensive prediction of chromosome dimer resolution sites in bacterial genomes. *BMC Genomics* **12**: 19.
- Kuempel, P., A. Høgaard, M. Nielsen, O. Nagappan & M. Tecklenburg, (1996) Use of a transposon (Tndif) to obtain suppressing and nonsuppressing insertions of the dif resolvase site of *Escherichia coli*. *Genes Dev* **10**: 1162-1171.
- Kuempel, P.L., S.A. Duerr & P.D. Maglothlin, (1978) Chromosome replication in an *Escherichia coli* dnaA mutant integratively suppressed by prophage P2. *J Bacteriol* **134**: 902-912.
- Kuempel, P.L., S.A. Duerr & N.R. Seeley, (1977) Terminus region of the chromosome in *Escherichia coli* inhibits replication forks. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**: 3927-3931.
- Kuempel, P.L., J.M. Henson, L. Dircks, M. Tecklenburg & D.F. Lim, (1991) dif, a recA-independent recombination site in the terminus region of the chromosome of *Escherichia coli*. *New Biol* **3**: 799-811.
- Kuzminov, A., (1995) Collapse and repair of replication forks in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **16**: 373-384.
- Lau, I.F., S.R. Filipe, B. Søballe, O.A. Økstad, F.X. Barre & D.J. Sherratt, (2003) Spatial and

- temporal organization of replicating *Escherichia coli* chromosomes. *Mol Microbiol* **49**: 731-743.
- Lee, J.Y., I.J. Finkelstein, E. Crozat, D.J. Sherratt & E.C. Greene, (2012) Single-molecule imaging of DNA curtains reveals mechanisms of KOPS sequence targeting by the DNA translocase FtsK. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**: 6531-6536.
- Lemon, K.P. & A.D. Grossman, (1998) Localization of bacterial DNA polymerase: evidence for a factory model of replication. *Science* **282**: 1516-1519.
- Lemon, K.P. & A.D. Grossman, (2000) Movement of replicating DNA through a stationary replisome. *Mol Cell* **6**: 1321-1330.
- Lemon, K.P. & A.D. Grossman, (2001) The extrusion-capture model for chromosome partitioning in bacteria. *Genes Dev* **15**: 2031-2041.
- Leslie, N.R. & D.J. Sherratt, (1995) Site-specific recombination in the replication terminus region of *Escherichia coli*: functional replacement of dif. *EMBO J* **14**: 1561-1570.
- Lesterlin, C., F.X. Barre & F. Cornet, (2004) Genetic recombination and the cell cycle: what we have learned from chromosome dimers. *Mol Microbiol* **54**: 1151-1160.
- Lesterlin, C., E. Gigant, F. Boccard & O. Espéli, (2012) Sister chromatid interactions in bacteria revealed by a site-specific recombination assay. *EMBO J* **31**: 3468-3479.
- Lesterlin, C., R. Mercier, F. Boccard, F.X. Barre & F. Cornet, (2005) Roles for replicohores and macrodomains in segregation of the *Escherichia coli* chromosome. *EMBO Rep* **6**: 557-562.
- Lesterlin, C., C. Pages, N. Dubarry, S. Dasgupta & F. Cornet, (2008) Asymmetry of chromosome Replicohores renders the DNA translocase activity of FtsK essential for cell division and cell shape maintenance in *Escherichia coli*. *PLoS Genet* **4**: e1000288.
- Levy, O., J.L. Ptacin, P.J. Pease, J. Gore, M.B. Eisen, C. Bustamante & N.R. Cozzarelli, (2005) Identification of oligonucleotide sequences that direct the movement of the *Escherichia coli* FtsK translocase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 17618-17623.
- Lewis, P.J. & J. Errington, (1997) Direct evidence for active segregation of oriC regions of the *Bacillus subtilis* chromosome and co-localization with the SpoOJ partitioning protein. *Mol Microbiol* **25**: 945-954.
- Li, Y., K. Sergueev & S. Austin, (2002) The segregation of the *Escherichia coli* origin and terminus of replication. *Mol Microbiol* **46**: 985-996.
- Li, Y., N.K. Stewart, A.J. Berger, S. Vos, A.J. Schoeffler, J.M. Berger, B.T. Chait & M.G. Oakley, (2010) *Escherichia coli* condensin MukB stimulates topoisomerase IV activity by a direct physical interaction. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**: 18832-18837.
- Li, Y., C.S. Weitzel, R.J. Arnold & M.G. Oakley, (2009) Identification of interacting regions within the coiled coil of the *Escherichia coli* structural maintenance of chromosomes protein MukB. *J Mol Biol* **391**: 57-73.
- Li, Y., B. Youngren, K. Sergueev & S. Austin, (2003) Segregation of the *Escherichia coli* chromosome terminus. *Mol Microbiol* **50**: 825-834.
- Li, Z. & G.J. Jensen, (2009) Electron cryotomography: a new view into microbial ultrastructure. *Curr Opin Microbiol* **12**: 333-340.
- Libby, E.A., M. Roggiani & M. Goulian, (2012) Membrane protein expression triggers chromosomal locus repositioning in bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**: 7445-7450.
- Lin, D.C., P.A. Levin & A.D. Grossman, (1997) Bipolar localization of a chromosome partition protein in *Bacillus subtilis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**: 4721-4726.
- Liu, X., X. Wang, R. Reyes-Lamothe & D. Sherratt, (2010) Replication-directed sister chromosome alignment in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **75**: 1090-1097.
- Lobry, J.R. & N. Sueoka, (2002) Asymmetric directional mutation pressures in bacteria. *Genome Biol* **3**: RESEARCH0058.
- LONGUET-HIGGINS, H.C., (1960) On the origin of the free radical property of melanins. *Arch Biochem Biophys* **86**: 231-232.

- Louarn, J., F. Cornet, V. François, J. Patte & J.M. Louarn, (1994) Hyperrecombination in the terminus region of the Escherichia coli chromosome: possible relation to nucleoid organization. *J Bacteriol* **176**: 7524-7531.
- Louarn, J., J. Patte & J.M. Louarn, (1977) Evidence for a fixed termination site of chromosome replication in Escherichia coli K12. *J Mol Biol* **115**: 295-314.
- Louarn, J.M., J. Louarn, V. François & J. Patte, (1991) Analysis and possible role of hyperrecombination in the termination region of the Escherichia coli chromosome. *J Bacteriol* **173**: 5097-5104.
- Löwe, J. & L.A. Amos, (2009) Evolution of cytomotive filaments: the cytoskeleton from prokaryotes to eukaryotes. *Int J Biochem Cell Biol* **41**: 323-329.
- Löwe, J., A. Ellonen, M.D. Allen, C. Atkinson, D.J. Sherratt & I. Grainge, (2008) Molecular mechanism of sequence-directed DNA loading and translocation by FtsK. *Mol Cell* **31**: 498-509.
- Madabhushi, R. & K.J. Mariani, (2009) Actin homolog MreB affects chromosome segregation by regulating topoisomerase IV in Escherichia coli. *Mol Cell* **33**: 171-180.
- Marquis, K.A., B.M. Burton, M. Nollmann, J.L. Ptacin, C. Bustamante, S. Ben-Yehuda & D.Z. Rudner, (2008) SpoIIIE strips proteins off the DNA during chromosome translocation. *Genes Dev* **22**: 1786-1795.
- Massey, T.H., C.P. Mercogliano, J. Yates, D.J. Sherratt & J. Löwe, (2006) Double-stranded DNA translocation: structure and mechanism of hexameric FtsK. *Mol Cell* **23**: 457-469.
- Masters, M. & P. Broda, (1971) Evidence for the bidirectional replications of the Escherichia coli chromosome. *Nat New Biol* **232**: 137-140.
- McInerney, P., A. Johnson, F. Katz & M. O'Donnell, (2007) Characterization of a triple DNA polymerase replisome. *Mol Cell* **27**: 527-538.
- Meile, J.C., R. Mercier, M. Stouf, C. Pages, J.Y. Bouet & F. Cornet, (2011) The terminal region of the E. coli chromosome localises at the periphery of the nucleoid. *BMC Microbiol* **11**: 28.
- Melby, T.E., C.N. Ciampaglio, G. Briscoe & H.P. Erickson, (1998) The symmetrical structure of structural maintenance of chromosomes (SMC) and MukB proteins: long, antiparallel coiled coils, folded at a flexible hinge. *J Cell Biol* **142**: 1595-1604.
- Mercier, R., M.A. Petit, S. Schbath, S. Robin, M. El Karoui, F. Boccard & O. Espéli, (2008) The MatP/matS site-specific system organizes the terminus region of the E. coli chromosome into a macrodomain. *Cell* **135**: 475-485.
- Michelsen, O., M.J. Teixeira de Mattos, P.R. Jensen & F.G. Hansen, (2003) Precise determinations of C and D periods by flow cytometry in Escherichia coli K-12 and B/r. *Microbiology* **149**: 1001-1010.
- Montero Llopis, P., A.F. Jackson, O. Sliusarenko, I. Surovtsev, J. Heinritz, T. Emonet & C. Jacobs-Wagner, (2010) Spatial organization of the flow of genetic information in bacteria. *Nature* **466**: 77-81.
- Murphy, L.D. & S.B. Zimmerman, (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.
- Männik, J., F. Wu, F.J. Hol, P. Bisicchia, D.J. Sherratt, J.E. Keymer & C. Dekker, (2012) Robustness and accuracy of cell division in Escherichia coli in diverse cell shapes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**: 6957-6962.
- Nagarajavel, V., S. Madhusudan, S. Dole, A.R. Rahmouni & K. Schnetz, (2007) Repression by binding of H-NS within the transcription unit. *J Biol Chem* **282**: 23622-23630.
- Nielsen, H.J., Y. Li, B. Youngren, F.G. Hansen & S. Austin, (2006a) Progressive segregation of the Escherichia coli chromosome. *Mol Microbiol* **61**: 383-393.
- Nielsen, H.J., J.R. Ottesen, B. Youngren, S.J. Austin & F.G. Hansen, (2006b) The Escherichia coli chromosome is organized with the left and right chromosome arms in separate

- cell halves. *Mol Microbiol* **62**: 331-338.
- Nielsen, H.J., B. Youngren, F.G. Hansen & S. Austin, (2007) Dynamics of Escherichia coli chromosome segregation during multifork replication. *J Bacteriol* **189**: 8660-8666.
- Niki, H., (2004) [A centromere like site on the E. coli chromosome]. *Tanpakushitsu Kakusan Koso* **49**: 2017-2023.
- Niki, H., S. Hiraga & S. Moriya, (2000) [Progressing molecular cell biology in bacteria: chromosome partitioning and cell division]. *Tanpakushitsu Kakusan Koso* **45**: 153-163.
- Nogales, E., (2000) Structural insights into microtubule function. *Annu Rev Biochem* **69**: 277-302.
- Nolivos, S., C. Pages, P. Rousseau, P. Le Bourgeois & F. Cornet, (2010) Are two better than one? Analysis of an FtsK/Xer recombination system that uses a single recombinase. *Nucleic Acids Res* **38**: 6477-6489.
- Nolivos, S., F. Touzain, C. Pages, M. Coddeville, P. Rousseau, M. El Karoui, P. Le Bourgeois & F. Cornet, (2012) Co-evolution of segregation guide DNA motifs and the FtsK translocase in bacteria: identification of the atypical Lactococcus lactis KOPS motif. *Nucleic Acids Res* **40**: 5535-5545.
- Nöllmann, M., N.J. Crisona & P.B. Arimondo, (2007) Thirty years of Escherichia coli DNA gyrase: from in vivo function to single-molecule mechanism. *Biochimie* **89**: 490-499.
- Pelletier, A.J., T.M. Hill & P.L. Kuempel, (1988) Location of sites that inhibit progression of replication forks in the terminus region of Escherichia coli. *J Bacteriol* **170**: 4293-4298.
- Peter, B.J., C. Ullsperger, H. Hiasa, K.J. Marians & N.R. Cozzarelli, (1998) The structure of supercoiled intermediates in DNA replication. *Cell* **94**: 819-827.
- Possoz, C., J. Newmark, N. Sorto, D.J. Sherratt & M.E. Tolmasky, (2007) Sublethal concentrations of the aminoglycoside amikacin interfere with cell division without affecting chromosome dynamics. *Antimicrob Agents Chemother* **51**: 252-256.
- Postow, L., C.D. Hardy, J. Arsuaga & N.R. Cozzarelli, (2004) Topological domain structure of the Escherichia coli chromosome. *Genes Dev* **18**: 1766-1779.
- Prescott, D.M. & P.L. Kuempel, (1972) Bidirectional replication of the chromosome in Escherichia coli. *Proc Natl Acad Sci U S A* **69**: 2842-2845.
- Ptacin, J.L., S.F. Lee, E.C. Garner, E. Toro, M. Eckart, L.R. Comolli, W.E. Moerner & L. Shapiro, (2010) A spindle-like apparatus guides bacterial chromosome segregation. *Nat Cell Biol* **12**: 791-798.
- Ptacin, J.L., M. Nöllmann, C. Bustamante & N.R. Cozzarelli, (2006) Identification of the FtsK sequence-recognition domain. *Nat Struct Mol Biol* **13**: 1023-1025.
- Pul, U., R. Wurm & R. Wagner, (2007) The role of LRP and H-NS in transcription regulation: involvement of synergism, allostery and macromolecular crowding. *J Mol Biol* **366**: 900-915.
- Péral, K., H. Capiiaux, J.B. Vincourt, J.M. Louarn, D.J. Sherratt & F. Cornet, (2001) Interplay between recombination, cell division and chromosome structure during chromosome dimer resolution in Escherichia coli. *Mol Microbiol* **39**: 904-913.
- Péral, K., F. Cornet, Y. Merlet, I. Delon & J.M. Louarn, (2000) Functional polarization of the Escherichia coli chromosome terminus: the dif site acts in chromosome dimer resolution only when located between long stretches of opposite polarity. *Mol Microbiol* **36**: 33-43.
- Rasmussen, T., R.B. Jensen & O. Skovgaard, (2007) The two chromosomes of Vibrio cholerae are initiated at different time points in the cell cycle. *EMBO J* **26**: 3124-3131.
- Rebollo, J.E., V. François & J.M. Louarn, (1988) Detection and possible role of two large nondivisible zones on the Escherichia coli chromosome. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**: 9391-9395.
- Recchia, G.D., M. Aroyo, D. Wolf, G. Blakely & D.J. Sherratt, (1999) FtsK-dependent and -

- independent pathways of Xer site-specific recombination. *EMBO J* **18**: 5724-5734.
- Reyes-Lamothe, R., E. Nicolas & D.J. Sherratt, (2012) Chromosome replication and segregation in bacteria. *Annu Rev Genet* **46**: 121-143.
- Reyes-Lamothe, R., C. Possoz, O. Danilova & D.J. Sherratt, (2008a) Independent positioning and action of Escherichia coli replisomes in live cells. *Cell* **133**: 90-102.
- Reyes-Lamothe, R., D.J. Sherratt & M.C. Leake, (2010) Stoichiometry and architecture of active DNA replication machinery in Escherichia coli. *Science* **328**: 498-501.
- Reyes-Lamothe, R., X. Wang & D. Sherratt, (2008b) Escherichia coli and its chromosome. *Trends Microbiol* **16**: 238-245.
- Rimsky, S. & A. Travers, (2011) Pervasive regulation of nucleoid structure and function by nucleoid-associated proteins. *Curr Opin Microbiol* **14**: 136-141.
- Ringgaard, S., J. van Zon, M. Howard & K. Gerdes, (2009) Movement and equipositioning of plasmids by ParA filament disassembly. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**: 19369-19374.
- Rocha, E.P., (2008) The organization of the bacterial genome. *Annu Rev Genet* **42**: 211-233.
- Rocha, E.P. & A. Danchin, (2003) Gene essentiality determines chromosome organisation in bacteria. *Nucleic Acids Res* **31**: 6570-6577.
- Rocha, E.P., M. Touchon & E.J. Feil, (2006) Similar compositional biases are caused by very different mutational effects. *Genome Res* **16**: 1537-1547.
- Roecklein, B., A. Pelletier & P. Kuempel, (1991) The tus gene of Escherichia coli: autoregulation, analysis of flanking sequences and identification of a complementary system in Salmonella typhimurium. *Res Microbiol* **142**: 169-175.
- Rovinskiy, N., A.A. Agbleke, O. Chesnokova, Z. Pang & N.P. Higgins, (2012) Rates of gyrase supercoiling and transcription elongation control supercoil density in a bacterial chromosome. *PLoS Genet* **8**: e1002845.
- Saleh, O.A., S. Bigot, F.X. Barre & J.F. Allemand, (2005) Analysis of DNA supercoil induction by FtsK indicates translocation without groove-tracking. *Nat Struct Mol Biol* **12**: 436-440.
- Saleh, O.A., C. Pérals, F.X. Barre & J.F. Allemand, (2004) Fast, DNA-sequence independent translocation by FtsK in a single-molecule experiment. *EMBO J* **23**: 2430-2439.
- Sawitzke, J.A. & S. Austin, (2000) Suppression of chromosome segregation defects of Escherichia coli muk mutants by mutations in topoisomerase I. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 1671-1676.
- Schneider, R., A. Travers, T. Kutateladze & G. Muskhelishvili, (1999) A DNA architectural protein couples cellular physiology and DNA topology in Escherichia coli. *Mol Microbiol* **34**: 953-964.
- Sciochetti, S.A., P.J. Piggot & G.W. Blakely, (2001) Identification and characterization of the dif Site from Bacillus subtilis. *J Bacteriol* **183**: 1058-1068.
- Sherratt, D.J., (2003) Bacterial chromosome dynamics. *Science* **301**: 780-785.
- Sherratt, D.J., L.K. Arciszewska, E. Crozat, J.E. Graham & I. Grainge, (2010) The Escherichia coli DNA translocase FtsK. *Biochem Soc Trans* **38**: 395-398.
- Shih, Y.L., T. Le & L. Rothfield, (2003) Division site selection in Escherichia coli involves dynamic redistribution of Min proteins within coiled structures that extend between the two cell poles. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 7865-7870.
- Sinden, R.R. & D.E. Pettijohn, (1981) Chromosomes in living Escherichia coli cells are segregated into domains of supercoiling. *Proc Natl Acad Sci U S A* **78**: 224-228.
- Sista, P.R., S. Mukherjee, P. Patel, G.S. Khatri & D. Bastia, (1989) A host-encoded DNA-binding protein promotes termination of plasmid replication at a sequence-specific replication terminus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**: 3026-3030.
- Sivanathan, V., M.D. Allen, C. de Bekker, R. Baker, L.K. Arciszewska, S.M. Freund, M. Bycroft, J. Löwe & D.J. Sherratt, (2006) The FtsK gamma domain directs oriented DNA translocation by interacting with KOPS. *Nat Struct Mol Biol* **13**: 965-972.
- Sivanathan, V., J.E. Emerson, C. Pages, F. Cornet, D.J. Sherratt & L.K. Arciszewska, (2009)

- KOPS-guided DNA translocation by FtsK safeguards Escherichia coli chromosome segregation. *Mol Microbiol* **71**: 1031-1042.
- Skarstad, K. & T. Katayama, (2013) Regulating DNA replication in bacteria. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **5**: a012922.
- Slater, S., S. Wold, M. Lu, E. Boye, K. Skarstad & N. Kleckner, (1995) E. coli SeqA protein binds oriC in two different methyl-modulated reactions appropriate to its roles in DNA replication initiation and origin sequestration. *Cell* **82**: 927-936.
- Sliusarenko, O., J. Heinritz, T. Emonet & C. Jacobs-Wagner, (2011) High-throughput, subpixel precision analysis of bacterial morphogenesis and intracellular spatio-temporal dynamics. *Mol Microbiol* **80**: 612-627.
- Spiers, A.J. & D.J. Sherratt, (1999) C-terminal interactions between the XerC and XerD site-specific recombinases. *Mol Microbiol* **32**: 1031-1042.
- Steiner, W.W. & P.L. Kuempel, (1998a) Cell division is required for resolution of dimer chromosomes at the dif locus of Escherichia coli. *Mol Microbiol* **27**: 257-268.
- Steiner, W.W. & P.L. Kuempel, (1998b) Sister chromatid exchange frequencies in Escherichia coli analyzed by recombination at the dif resolvase site. *J Bacteriol* **180**: 6269-6275.
- Stoebel, D.M., K. Hokamp, M.S. Last & C.J. Dorman, (2009) Compensatory evolution of gene regulation in response to stress by Escherichia coli lacking RpoS. *PLoS Genet* **5**: e1000671.
- Stokke, C., I. Flåtten & K. Skarstad, (2012) An easy-to-use simulation program demonstrates variations in bacterial cell cycle parameters depending on medium and temperature. *PLoS One* **7**: e30981.
- Stouf, M., J.C. Meile & F. Cornet, (2013) FtsK actively segregates sister chromosomes in Escherichia coli. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**: 11157-11162.
- Strunnikov, A.V., V.L. Larionov & D. Koshland, (1993) SMC1: an essential yeast gene encoding a putative head-rod-tail protein is required for nuclear division and defines a new ubiquitous protein family. *J Cell Biol* **123**: 1635-1648.
- Sullivan, N.L., K.A. Marquis & D.Z. Rudner, (2009) Recruitment of SMC by ParB-parS organizes the origin region and promotes efficient chromosome segregation. *Cell* **137**: 697-707.
- Sunako, Y., T. Onogi & S. Hiraga, (2001) Sister chromosome cohesion of Escherichia coli. *Mol Microbiol* **42**: 1233-1241.
- Tadesse, S., J. Mascarenhas, B. Kösters, A. Hasilik & P.L. Graumann, (2005) Genetic interaction of the SMC complex with topoisomerase IV in Bacillus subtilis. *Microbiology* **151**: 3729-3737.
- Tecklenburg, M., A. Naumer, O. Nagappan & P. Kuempel, (1995) The dif resolvase locus of the Escherichia coli chromosome can be replaced by a 33-bp sequence, but function depends on location. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**: 1352-1356.
- Teleman, A.A., P.L. Graumann, D.C. Lin, A.D. Grossman & R. Losick, (1998) Chromosome arrangement within a bacterium. *Curr Biol* **8**: 1102-1109.
- Thanbichler, M., (2010) Synchronization of chromosome dynamics and cell division in bacteria. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **2**: a000331.
- Thanbichler, M. & L. Shapiro, (2006) MipZ, a spatial regulator coordinating chromosome segregation with cell division in Caulobacter. *Cell* **126**: 147-162.
- Thiel, A., M. Valens, I. Vallet-Gely, O. Espéli & F. Boccard, (2012) Long-range chromosome organization in E. coli: a site-specific system isolates the Ter macrodomain. *PLoS Genet* **8**: e1002672.
- Tillier, E.R. & R.A. Collins, (2000) The contributions of replication orientation, gene direction, and signal sequences to base-composition asymmetries in bacterial genomes. *J Mol Evol* **50**: 249-257.
- Tonthat, N.K., S.T. Arold, B.F. Pickering, M.W. Van Dyke, S. Liang, Y. Lu, T.K. Beuria, W.

- Margolin & M.A. Schumacher, (2011) Molecular mechanism by which the nucleoid occlusion factor, SImA, keeps cytokinesis in check. *EMBO J* **30**: 154-164.
- Tonthat, N.K., S.L. Milam, N. Chinnam, T. Whitfill, W. Margolin & M.A. Schumacher, (2013) SImA forms a higher-order structure on DNA that inhibits cytokinetic Z-ring formation over the nucleoid. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**: 10586-10591.
- Toro, E. & L. Shapiro, (2010) Bacterial chromosome organization and segregation. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **2**: a000349.
- Umbarger, M.A., (2012) Chromosome conformation capture assays in bacteria. *Methods* **58**: 212-220.
- Umbarger, M.A., E. Toro, M.A. Wright, G.J. Porreca, D. Baù, S.H. Hong, M.J. Fero, L.J. Zhu, M.A. Marti-Renom, H.H. McAdams, L. Shapiro, J. Dekker & G.M. Church, (2011) The three-dimensional architecture of a bacterial genome and its alteration by genetic perturbation. *Mol Cell* **44**: 252-264.
- Val, M.E., S.P. Kennedy, M. El Karoui, L. Bonn e, F. Chevalier & F.X. Barre, (2008) FtsK-dependent dimer resolution on multiple chromosomes in the pathogen *Vibrio cholerae*. *PLoS Genet* **4**: e1000201.
- Valens, M., S. Penaud, M. Rossignol, F. Cornet & F. Boccard, (2004a) Macrodome organization of the *Escherichia coli* chromosome. *EMBO J* **23**: 4330-4341.
- Valens, M., S. Penaud, M. Rossignol, F. Cornet & F. Boccard, (2004b) Macrodome organization of the *Escherichia coli* chromosome. *EMBO J* **23**: 4330-4341.
- Vallet-Gely, I. & F. Boccard, (2013) Chromosomal organization and segregation in *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS Genet* **9**: e1003492.
- Vecchiarelli, A.G., Y.W. Han, X. Tan, M. Mizuuchi, R. Ghirlando, C. Biert mpfel, B.E. Funnell & K. Mizuuchi, (2010) ATP control of dynamic P1 ParA-DNA interactions: a key role for the nucleoid in plasmid partition. *Mol Microbiol* **78**: 78-91.
- Viollier, P.H., M. Thanbichler, P.T. McGrath, L. West, M. Meewan, H.H. McAdams & L. Shapiro, (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.
- Vogelmann, J., M. Ammelburg, C. Finger, J. Guezguez, D. Linke, M. Fl otenmeyer, Y.D. Stierhof, W. Wohlleben & G. Muth, (2011) Conjugal plasmid transfer in *Streptomyces* resembles bacterial chromosome segregation by FtsK/SpoIIIE. *EMBO J* **30**: 2246-2254.
- Vora, T., A.K. Hottes & S. Tavazoie, (2009) Protein occupancy landscape of a bacterial genome. *Mol Cell* **35**: 247-253.
- Wang, L. & J. Lutkenhaus, (1998) FtsK is an essential cell division protein that is localized to the septum and induced as part of the SOS response. *Mol Microbiol* **29**: 731-740.
- Wang, W., G.W. Li, C. Chen, X.S. Xie & X. Zhuang, (2011a) Chromosome organization by a nucleoid-associated protein in live bacteria. *Science* **333**: 1445-1449.
- Wang, X., C. Lesterlin, R. Reyes-Lamothe, G. Ball & D.J. Sherratt, (2011b) Replication and segregation of an *Escherichia coli* chromosome with two replication origins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**: E243-250.
- Wang, X., X. Liu, C. Possoz & D.J. Sherratt, (2006) The two *Escherichia coli* chromosome arms locate to separate cell halves. *Genes Dev* **20**: 1727-1731.
- Wang, X., P. Montero Llopis & D.Z. Rudner, (2013) Organization and segregation of bacterial chromosomes. *Nat Rev Genet* **14**: 191-203.
- Wang, X., C. Possoz & D.J. Sherratt, (2005) Dancing around the divisome: asymmetric chromosome segregation in *Escherichia coli*. *Genes Dev* **19**: 2367-2377.
- Wang, X., R. Reyes-Lamothe & D.J. Sherratt, (2008a) Modulation of *Escherichia coli* sister chromosome cohesion by topoisomerase IV. *Genes Dev* **22**: 2426-2433.
- Wang, X., R. Reyes-Lamothe & D.J. Sherratt, (2008b) Visualizing genetic *loci* and molecular machines in living bacteria. *Biochem Soc Trans* **36**: 749-753.

- Wang, X. & D.J. Sherratt, (2010) Independent segregation of the two arms of the *Escherichia coli* ori region requires neither RNA synthesis nor MreB dynamics. *J Bacteriol* **192**: 6143-6153.
- Warnecke, T., F. Supek & B. Lehner, (2012) Nucleoid-associated proteins affect mutation dynamics in *E. coli* in a growth phase-specific manner. *PLoS Comput Biol* **8**: e1002846.
- Webb, C.D., A. Teleman, S. Gordon, A. Straight, A. Belmont, D.C. Lin, A.D. Grossman, A. Wright & R. Losick, (1997) Bipolar localization of the replication origin regions of chromosomes in vegetative and sporulating cells of *B. subtilis*. *Cell* **88**: 667-674.
- Weinstein-Fischer, D. & S. Altuvia, (2007) Differential regulation of *Escherichia coli* topoisomerase I by Fis. *Mol Microbiol* **63**: 1131-1144.
- White, M.A., J.K. Eykelenboom, M.A. Lopez-Vernaza, E. Wilson & D.R. Leach, (2008) Non-random segregation of sister chromosomes in *Escherichia coli*. *Nature* **455**: 1248-1250.
- Worcel, A. & E. Burgi, (1972) On the structure of the folded chromosome of *Escherichia coli*. *J Mol Biol* **71**: 127-147.
- Wu, L.J. & J. Errington, (1994) *Bacillus subtilis* SpoIIIE protein required for DNA segregation during asymmetric cell division. *Science* **264**: 572-575.
- Wu, L.J. & J. Errington, (1997) Septal localization of the SpoIIIE chromosome partitioning protein in *Bacillus subtilis*. *EMBO J* **16**: 2161-2169.
- Wu, L.J. & J. Errington, (1998) Use of asymmetric cell division and spoIIIE mutants to probe chromosome orientation and organization in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* **27**: 777-786.
- Wu, L.J. & J. Errington, (2003) RacA and the Soj-Spo0J system combine to effect polar chromosome segregation in sporulating *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* **49**: 1463-1475.
- Wu, L.J. & J. Errington, (2004) Coordination of cell division and chromosome segregation by a nucleoid occlusion protein in *Bacillus subtilis*. *Cell* **117**: 915-925.
- Wu, L.J., A.H. Franks & R.G. Wake, (1995) Replication through the terminus region of the *Bacillus subtilis* chromosome is not essential for the formation of a division septum that partitions the DNA. *J Bacteriol* **177**: 5711-5715.
- Yamaichi, Y., R. Bruckner, S. Ringgaard, A. Möll, D.E. Cameron, A. Briegel, G.J. Jensen, B.M. Davis & M.K. Waldor, (2012) A multidomain hub anchors the chromosome segregation and chemotactic machinery to the bacterial pole. *Genes Dev* **26**: 2348-2360.
- Yamaichi, Y. & H. Niki, (2004) migS, a cis-acting site that affects bipolar positioning of oriC on the *Escherichia coli* chromosome. *EMBO J* **23**: 221-233.
- Yamanaka, K., T. Ogura, H. Niki & S. Hiraga, (1996) Identification of two new genes, mukE and mukF, involved in chromosome partitioning in *Escherichia coli*. *Mol Gen Genet* **250**: 241-251.
- Yamazoe, M., T. Onogi, Y. Sunako, H. Niki, K. Yamanaka, T. Ichimura & S. Hiraga, (1999) Complex formation of MukB, MukE and MukF proteins involved in chromosome partitioning in *Escherichia coli*. *EMBO J* **18**: 5873-5884.
- Yates, J., M. Aroyo, D.J. Sherratt & F.X. Barre, (2003) Species specificity in the activation of Xer recombination at dif by FtsK. *Mol Microbiol* **49**: 241-249.
- Yu, D., H.M. Ellis, E.C. Lee, N.A. Jenkins, N.G. Copeland & D.L. Court, (2000) An efficient recombination system for chromosome engineering in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 5978-5983.
- Yu, X.C., A.H. Tran, Q. Sun & W. Margolin, (1998a) Localization of cell division protein FtsK to the *Escherichia coli* septum and identification of a potential N-terminal targeting domain. *J Bacteriol* **180**: 1296-1304.
- Yu, X.C., E.K. Weihe & W. Margolin, (1998b) Role of the C terminus of FtsK in *Escherichia*

coli chromosome segregation. *J Bacteriol* **180**: 6424-6428.

Zechiedrich, E.L. & N.R. Cozzarelli, (1995) Roles of topoisomerase IV and DNA gyrase in DNA unlinking during replication in Escherichia coli. *Genes Dev* **9**: 2859-2869.

VI-Annexes

Annexe I

A Defined Terminal Region of the *E. coli* Chromosome Shows Late Segregation and High FtsK Activity

Marie Deghorain^{1,2,3,9}^{¶a}, Carine Pagès^{1,2,9}, Jean-Christophe Meile^{1,2}, Mathieu Stouf^{1,2}, Hervé Capioux^{1,2,9}^{¶b}, Romain Mercier^{1,2,9}^{¶c}, Christian Lesterlin^{1,2,9}^{¶d}, Bernard Hallet³, François Cornet^{1,2,*}

1 Laboratoire de Microbiologie et de Génétique Moléculaire, CNRS, Toulouse, France, **2** Université de Toulouse, Université Paul Sabatier, Toulouse, France, **3** Université Catholique de Louvain, Institut des Sciences de la Vie, Unité de Génétique, Louvain-La-Neuve, Belgium

Abstract

Background: The FtsK DNA-translocase controls the last steps of chromosome segregation in *E. coli*. It translocates sister chromosomes using the KOPS DNA motifs to orient its activity, and controls the resolution of dimeric forms of sister chromosomes by XerCD-mediated recombination at the *dif* site and their decatenation by TopoIV.

Methodology: We have used XerCD/*dif* recombination as a genetic trap to probe the interaction of FtsK with loci located in different regions of the chromosome. This assay revealed that the activity of FtsK is restricted to a ~400 kb terminal region of the chromosome around the natural position of the *dif* site. Preferential interaction with this region required the tethering of FtsK to the division septum via its N-terminal domain as well as its translocation activity. However, the KOPS-recognition activity of FtsK was not required. Displacement of replication termination outside the FtsK high activity region had no effect on FtsK activity and deletion of a part of this region was not compensated by its extension to neighbouring regions. By observing the fate of fluorescent-tagged loci of the *ter* region, we found that segregation of the FtsK high activity region is delayed compared to that of its adjacent regions.

Significance: Our results show that a restricted terminal region of the chromosome is specifically dedicated to the last steps of chromosome segregation and to their coupling with cell division by FtsK.

Citation: Deghorain M, Pagès C, Meile J-C, Stouf M, Capioux H, et al. (2011) A Defined Terminal Region of the *E. coli* Chromosome Shows Late Segregation and High FtsK Activity. PLoS ONE 6(7): e22164. doi:10.1371/journal.pone.0022164

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

Received: April 5, 2011; **Accepted:** June 16, 2011; **Published:** July 20, 2011

Copyright: © 2011 Deghorain et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was funded by the CNRS, Université Paul Sabatier, Université de Toulouse, ACI contract JC5010, ANR contract BLAN06-2 134012 and the Fondation pour la Recherche Médicale (to MD). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

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

* E-mail: Francois.Cornet@ibcg.biotoul.fr

¶ These authors contributed equally to this work.

¶a Current address: Institut de biologie et de médecine moléculaire, Université Libre de Bruxelles, Gosselies, Belgium

¶b Current address: IUT La Roche sur Yon, Département Génie Biologique, Université de Nante, Nante, France

¶c Current address: Institute for Cell and Molecular Biosciences, The Medical School, University of Newcastle, Newcastle, United Kingdom

¶d Current address: Department of Biochemistry, University of Oxford, Oxford, United Kingdom

Introduction

Bacterial chromosomes consist of single replication units and are organised in two replichores of opposite polarity from the replication origin (*ori*) to the opposite termination region (*ter*), which has a profound impact on their dynamics [1]. Segregation of chromosome loci occurs shortly after their replication and thus occurs progressively along the replichores [2,3]. The *ori* and *ter* regions are the sites of specific activities dedicated to the initial and final steps of segregation, respectively. In *E. coli*, the final steps of segregation occur shortly before and during cell division. They involve the removal of catenation links by TopoIV topoisomerase and resolution of chromosome dimers by the XerCD/*dif* site-specific recombination system [4,5]. The FtsK protein, a DNA translocase associated with the division septum, controls both activities. FtsK, TopoIV and the Xer recombination system are highly conserved in bacteria and have been shown to play roles similar to their *E. coli* homologs in several evolutionary remote organisms [6,7,8,9,10].

FtsK is an ATP-driven dsDNA-translocase required for both cell division and faithful chromosome segregation (reviewed in [11,12]). In *E. coli*, different domains of FtsK achieve its different activities. Its N-terminal domain, FtsK_N, is essential for growth and cell division, and contains transmembrane helices that link FtsK to the division septum [13,14]. The central domain, FtsK_L, is non-essential for growth but is involved in interactions with other cell division proteins [15,16,17,18]. The C-terminal domain, FtsK_C, is also dispensable but involved in chromosome segregation. It carries Walker-type ATPase motifs and forms a hexameric motor that translocates dsDNA [19,20]. It also interacts with TopoIV and activates its decatenation activity *in vitro* [21,22]. FtsK_C can be subdivided into three subdomains based on their structure, function and sequence conservation [20,23]. The FtsK_α and FtsK_β subdomains form the translocation motor while the extreme C-terminal subdomain, FtsK_γ, controls the translocation activity [24]. FtsK_γ contains a winged-helix DNA-binding domain that recognises specific DNA motifs, the KOPS [23,25,26,27].

KOPS motifs are inversely oriented on the two chromosome replichores, thereby directing translocation towards the *dif* dimer resolution site located at the terminal replicore junction [26,28,29,30,31]. FtsK γ also interacts with XerD and activates XerCD/*dif* recombination [32,33,34].

The FtsK_C motor assembles as a hexamer upon interaction with DNA [27]. Although it can interact with non-specific DNA, FtsK_C preferentially interacts with the KOPS motif, which orients translocation at the loading step [26,27,30]. The fact that KOPS motifs are over-represented and their orientation biased towards the *dif* site along the entire chromosome [28] raises the question of the interaction of FtsK with the different chromosome regions. The *ter* region is susceptible to high frequencies of DNA breakage, which are thought to occur specifically in unresolved dimers [5]. Interestingly, the region concerned by DNA breakage is larger in an *ftsK* mutant than in a *xer*- mutant [35]. From these data, it was postulated that FtsK is involved in the positioning of a 250 kb region extending anti-clockwise from *dif* near the septum (analyses was not extended to the clockwise side). We have used XerCD/*dif* recombination to probe the interaction of different chromosome loci with FtsK. This revealed that FtsK acts in a specific ~400 kb region around the natural position of *dif*, thereby defining a region of preferential FtsK activity. The preferential interaction of FtsK with this region depends on both the translocation activity of FtsK and its tethering to the division septum, but not on its KOPS-recognition activity. Although replication normally terminates close to *dif*, displacement of termination did not modify the activity of FtsK in this region. Deletion of parts of the FtsK high activity region or its adjacent regions led to its shortening rather than its extension to adjacent regions. We also show that the segregation of sister FtsK high activity region is delayed compared with that of adjacent regions. We conclude that a restricted region of the chromosome is specifically dedicated to the last steps of segregation and to its coupling with cell division by the FtsK protein.

Results

FtsK acts in a restricted region of the chromosome

Recombination between *dif* sites requires a direct interaction between FtsK γ and XerD [32,33]. We reasoned that XerCD/*dif* recombination could be used to measure the relative frequencies at which FtsK interacts with different chromosome loci. To this end, we

constructed a *dif-lacI-dif* cassette and inserted it in the chromosome of a strain deleted for *dif*, *lacI* and *xerC* (Figure 1A; Materials and methods). Recombination between *dif* sites was induced by transformation with the XerC-producing plasmid pFC241, which provoked the loss of *lacI* and derepression of the *lacZ* gene thus allowing the measurement of recombination frequencies from the formation of blue colonies on indicator plates (Figure 1A).

The *dif-lacI-dif* cassette was inserted at 18 different chromosome loci (Figure 1B; Materials and methods). Recombination was scored in the resulting strains and in $\Delta(\text{ftsK}_{LC})$ derivatives to measure the level of FtsK_C-dependent recombination. As previously reported, FtsK_C-dependent recombination was most frequent at the natural position of *dif* (Figure 2). This locus is the only one assayed inside the previously defined *dif* activity zone (DAZ), which is the zone where oppositely oriented KOPS converge, where inserted *dif* sites can resolve chromosome dimers efficiently [28,36,37]. FtsK reaches this locus at least in every cell harbouring a chromosome dimer (i.e. about 15% of the cells/generation in these growth conditions [37]), hence the high frequency of recombination observed. Recombination was low (<0.1%) at loci located more than 200 kb from the natural *dif* position (Figure 2). Nevertheless, comparison with $\Delta(\text{ftsK}_{LC})$ strains showed that these low levels of recombination still largely depend on FtsK_C (compare blue to red dots in Figure 2). FtsK can thus interact with most of the chromosome, although very infrequently with loci far from the natural *dif* position. Interestingly, loci located within a ~400 kb long region around the natural position of *dif* displayed higher frequencies of FtsK_C-dependent recombination (about 1%; Figure 2). In this region, the recombination frequencies only slightly decreased with increasing distance from the natural *dif* position whereas frequencies decreased abruptly in the adjacent regions. Notably, *dif* sites inserted at all positions but the natural *dif* position do not resolve dimers efficiently [37], implying that most recombination events occurred on monomeric chromosomes. We conclude that FtsK preferentially interacts with a ~400 kb long located in the terminal part of the chromosome.

Roles of the different FtsK domains

To investigate which features of FtsK are required for its preferential interaction with the FtsK high activity region, we first produced FtsK_C detached from FtsK_N from plasmid pFX150 in

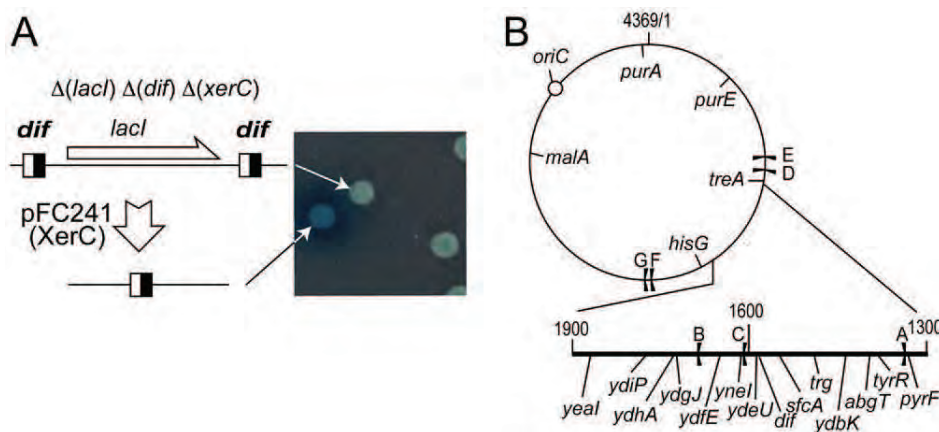


Figure 1. Measuring FtsK Activity. (A) The *dif-lacI-dif* cassette is shown with the *dif* sites as black and white squares. It was inserted at chosen loci of a $\Delta(\text{xerC})\Delta(\text{dif})\Delta(\text{lacI})$ strain. Transformation with the XerC-producing plasmid pFC241 allows recombination, giving rise to blue colonies on indicator medium (right). (B) Map of the chromosome with the insertion loci used for insertion of the *dif-lacI-dif* or *parS-Kn* cassettes. The replication origin (closed circle) and replication terminators (black flags) are indicated. Coordinates are in Kb. doi:10.1371/journal.pone.0022164.g001

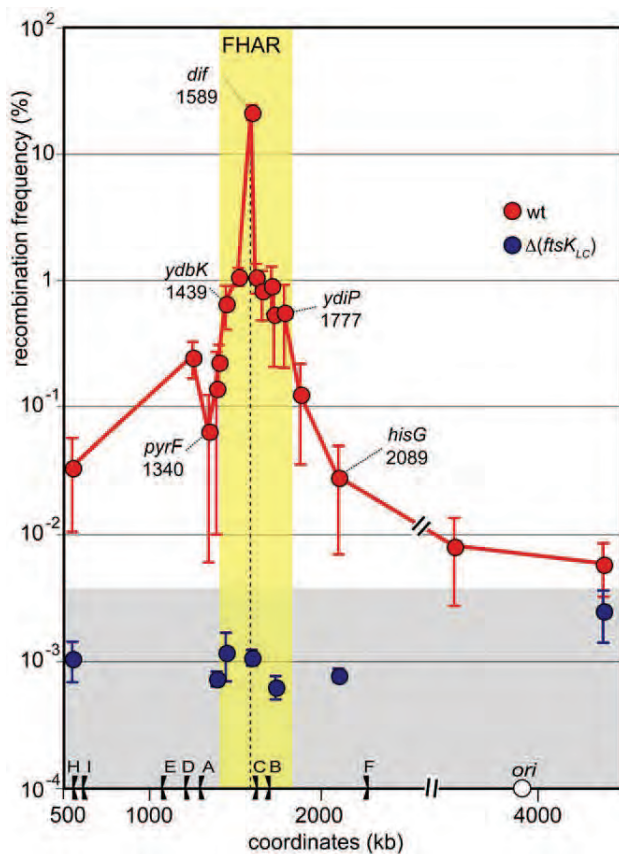


Figure 2. FtsK acts in a restricted region of the chromosome. The *dif-lacI-dif* cassette was inserted at chosen loci and recombination was scored. Y-axis: recombination frequency measured at each locus (calculated frequency of recombination per generation; mean of 5 independent measurements with standard deviation; Materials and methods). X-axis: coordinate of the insertion loci (positions of a subset of loci are shown on the graph). The dashed line indicates the natural position of *dif*, the flags the replication terminators with corresponding letters (A to F) and the open circle the replication origin. Coordinates are in kb. Red dots: *ftsKwt* strains; blue dots: $\Delta(ftsK_{LC})$ strains. The yellow zone indicates the extent of the FtsK high activity region and the grey zone the FtsK-independent recombination background. doi:10.1371/journal.pone.0022164.g002

$\Delta(ftsK_{LC})$ strains (Materials and Methods). Production of FtsK_C was induced using 0.03% arabinose, which yields a low but detectable level of protein [19]. As expected, this resulted in high recombination frequencies (red dots in Figure 3). Importantly, recombination frequencies were equivalent at all loci assayed (Figure 3). These results show that FtsK_C can interact with the different chromosome regions at equivalent frequencies when unlinked from the division septum. It also follows that the XerCD recombinases have equal access to *dif* sites inserted into the different chromosome regions. We infer from these data that the restriction of FtsK activity to the FtsK high activity region depends on the tethering of FtsK to the division septum by FtsK_N.

FtsK_C exhibit three distinct activities: it translocates DNA via the FtsK $\alpha\beta$ motor, it recognises KOPS and induces XerCD/*dif* recombination via the FtsK γ subdomain. We used *ftsK* mutant alleles to separate these activities. The $\Delta(ftsK_{\gamma})$ allele encodes a protein that translocates DNA but neither recognises KOPS nor induces recombination [27,38]. Consistently, recombination frequencies in $\Delta(ftsK_{\gamma})$ strains were as low as in $\Delta(ftsK_{LC})$ strains

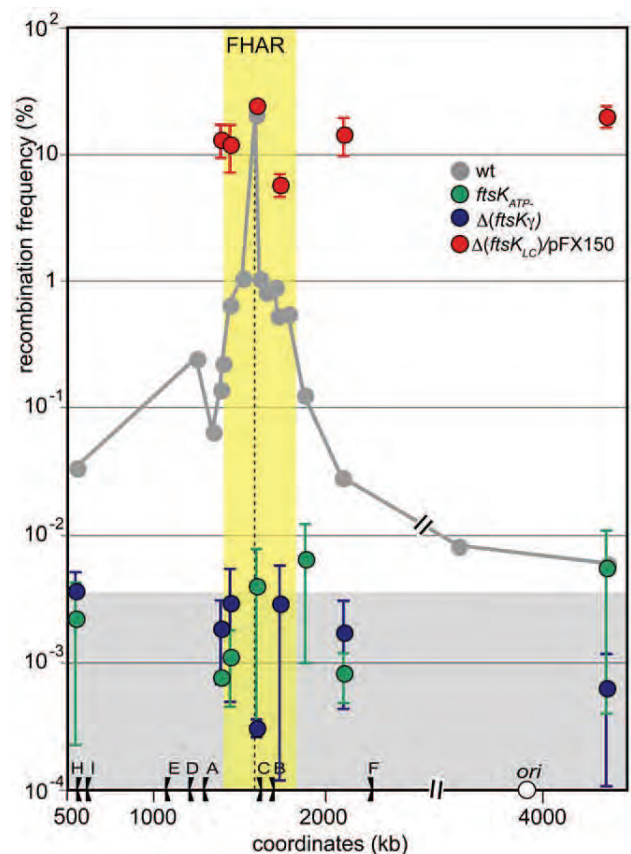


Figure 3. Preferential interaction with the FtsK high activity region requires all domains of FtsK. Same legend as Figure 2. The grey curve corresponds to *ftsKwt* strains and is redrawn from figure 2. Recombination frequencies were measured at chosen loci in different *ftsK* mutant: Green dots: *ftsK_{ATP}*; blue dots: $\Delta(ftsK_{\gamma})$; red dots $\Delta(ftsK_{LC})$ strains producing FtsK_C from plasmid pFX150 (Materials and methods). The yellow zone indicates extend of the FtsK high activity region and the grey zone the FtsK-independent recombination background (see Figure 2). doi:10.1371/journal.pone.0022164.g003

at all loci assayed (blue dots in Figure 3), confirming that no FtsK-dependent induction of XerCD/*dif* recombination can occur in the absence of FtsK γ . The *ftsK_{ATP}* allele encodes a protein that does not translocate DNA but carries an intact FtsK γ subdomain. Recombination frequencies in *ftsK_{ATP}* strains were undistinguishable from those in $\Delta(ftsK_{LC})$ and $\Delta(ftsK_{\gamma})$ strains (green dots in Figure 3). We conclude that recombination induction requires both an intact FtsK γ subdomain and DNA translocation activity at all loci assayed. It follows that our recombination assay measures the capacity of FtsK to translocate the different regions of the chromosome rather than just to interact with the XerCD/*dif* complexes they carry.

Role of the KOPS recognition activity of FtsK

Although FtsK can recognise and translocate any DNA *in vitro*, it does so preferentially with KOPS motifs [23,27,30]. This prompted us to investigate how the KOPS recognition activity controls the interaction of FtsK with the chromosome. We used the *ftsK_{KOPSblind}* allele of FtsK, which does not recognise the KOPS motif and so translocates DNA in a non-oriented manner [23,31,33]. Inactivating KOPS recognition lowered recombination at the natural *dif* position (red dots in Figure 4). This is

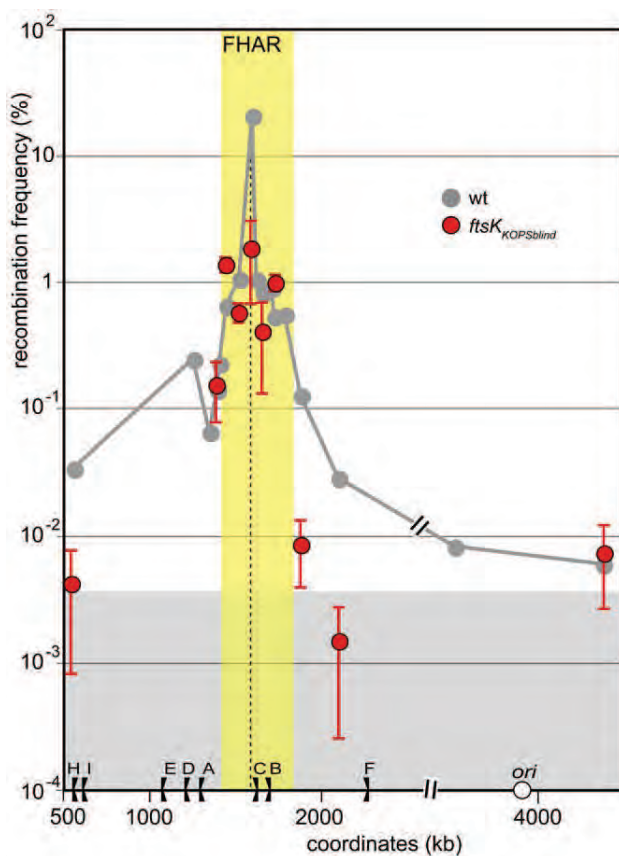


Figure 4. KOPS recognition is not required for preferential interaction of FtsK with the FtsK high activity region. Same legend as Figure 2 and 3. Grey curve: *ftsK*^{wt}, redrawn from figure 2; red dots *ftsK*_{KOPSblind}. The yellow zone indicates the FtsK high activity region and the grey zone the FtsK-independent recombination background (see Figure 2).

doi:10.1371/journal.pone.0022164.g004

consistent with a reduced capacity of the *FtsK*_{KOPSblind} protein to reach the position where KOPS orientations converge compared to the wild type *FtsK* and with the accompanying partial defect in chromosome dimer resolution in *ftsK*_{KOPSblind} strains [31]. In contrast, recombination frequencies appeared unchanged at loci located inside the *FtsK* high activity region or in its left transition zone (compare red to grey dots in Figure 4). This shows that KOPS recognition is not required for *FtsK* to translocate this region. Importantly, the *FtsK* high activity region did not expand in *ftsK*_{KOPSblind} compared to wt strains, showing that the restriction of *FtsK* activity to this region is not due to KOPS-mediated orientation of *FtsK* translocation. Indeed, recombination frequencies at loci located outside the *FtsK* high activity region were undistinguishable from that of *FtsK*-independent recombination (Figure 4). Thus, the *FtsK*_{KOPSblind} protein is unable to translocate DNA at loci located outside the *FtsK* high activity region whereas the wild type *FtsK* can do so, although at a low frequency.

No role for termination of replication

The *FtsK* high activity region is the last chromosome region replicated. Half of it is contained in the replication fork trap (the zone between TerA and TerC, Figure 2). In most cells, replication terminates in the vicinity of the TerC terminator, which is located near the natural *dif* position [39,40]. We examined a possible role

for termination of replication in the control of *FtsK* activity by inserting an extra replication terminator, *psrA*^{*}, at position 1390 kb (Materials and methods). This restricts termination to a 50 kb zone located outside the *FtsK* high activity region (Figure 5). Insertion of *psrA*^{*} affected only slightly if at all the recombination frequencies at the loci assayed (red dots in Figure 5). In particular, the *ydbK* locus is located inside the replication fork trap in wt strains and outside it in *psrA*^{*} strains whereas the *pyrF* locus is far from most termination events in wt strains and close to them in strains harbouring *psrA*^{*} (Figure 5). Insertion of *psrA*^{*} did not significantly change the recombination frequencies at these two loci. Moreover, inactivation of the Tus protein, which is required for termination at terminator sites, had no significant effect on recombination frequencies (green dots in Figure 5). We conclude that the high activity of *FtsK* does not result from the location of replication termination in the concerned region but rather is linked to its post-replicative processing.

The *FtsK* high activity region can be shortened by deletion

A large terminal part of the chromosome, from 1349 to 1712 kb, contains no essential gene and can be deleted [41,42].

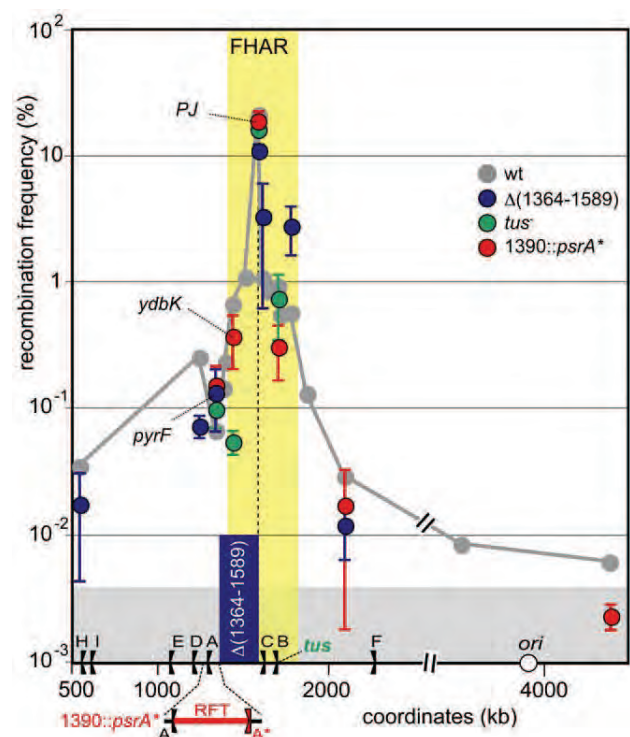


Figure 5. Specificity of the *FtsK* high activity region. Same legend as Figure 2 and 3. Green dots: strains were mutated for the *tus* gene. The position of the *tus* gene is indicated on the X-axis. Red dots: An additional replication terminator, *psrA*^{*} (A*), was inserted at position 1390. The resulting restricted replication fork trap (RFT) is shown in red below the X-axis. Blue dots: strains were deleted of the 1364–1589 fragment (Materials and methods). The deleted fragment is shown as the blue bar. Positions of a subset of loci are shown on the graph. PJ indicates the junction of KOPS polarity (i.e., the endpoints of the deletion in the $\Delta(1364-1589)$ strain and the natural position of *dif* in the other strains. The yellow zone indicates extend of the *FtsK* high activity region and the grey zone the *FtsK*-independent recombination background (see Figure 2).

doi:10.1371/journal.pone.0022164.g005

This prompted us to observe the effect of deleting a part of the FtsK high activity region. We constructed a large deletion of 224 kb to the left of the natural *dif* position that contains the left part of the FtsK high activity region and its transition zone (Materials and Methods; Figure 5). Recombination frequencies were then scored at different loci in strains carrying this deletion. As expected, the endpoints of the deletion supported a high frequency of recombination because it is a new zone of converging KOPS (polarity junction (PJ) in Figure 5; [37]). However, this frequency was slightly less than in the wt strain at the *dif* position, suggesting that deletion of half of the FtsK high activity region lowers the capacity of FtsK to reach the zone of converging KOPS. Microscopic observation did not reveal filament formation in the deletion strain carrying the *dif* site in the zone of converging KOPS, indicating that resolution of chromosome dimers was not affected by the deletion (data not shown). Recombination frequencies at loci located inside the remaining part of the FtsK high activity region were higher than in the absence of deletion (blue dots in Figure 5). Thus, FtsK appears to translocate loci of the shortened FtsK high activity region more often than the same loci in the wt strain. Recombination frequencies at loci located outside the FtsK high activity region did not differ significantly from those of the wt strains (Figure 5). Notably, this is the case at the *pyrF* locus, which is located only 24 kb away from the zone of converging KOPS in the strain carrying the deletion. We conclude that deletion of the left half of the FtsK high activity region does not provoke its extension to adjacent sequences but rather its shortening.

The FtsK high activity region displays a specific segregation pattern

The terminal region of the chromosome is the last to be replicated and segregated. Numerous studies have shown that loci of the terminal region tend to remain at the cell centre long after their replication before being segregated to daughter cells [43,44,45,46]. This prompted us to observe the segregation timing of loci located within or outside the FtsK high activity region. Loci were tagged with the bacteriophage P1 *parS* site, which allows them to be detected by microscopy as fluorescent foci upon production of the GFP- Δ 30ParB fluorescent protein that specifically binds *parS* [47]. Strains harbouring *parS* insertions were grown to exponential phase in conditions reported to avoid the intrinsic cohesion due to the *parS*/GFP- Δ 30ParB system and examined by fluorescence microscopy [48] (Figure S1; Materials and methods). In these conditions, neither the insertion of the *parS* site nor the production of the GFP- Δ 30ParB protein had detectable effects on the doubling time or on the shape and length distribution of cells of any of the strains used (data not shown). For better comparison with the recombination frequencies pattern, we measured recombination at the different loci in the growth conditions used for microscopy. This did not significantly modify the recombination frequency at any locus (data not shown). As all loci assayed were near the replication terminus, the vast majority of the cells harboured one or two fluorescent foci (fewer than 3% of the cells had more than two foci; Figure S1). For each strain, we measured the fraction of cells harbouring a single fluorescent focus, which increases directly with the time taken by the different loci to segregate. The results presented in figure 6A show that the fraction of single-focus cells was higher for loci located inside the FtsK high activity region than for loci outside this region. To corroborate this observation, we analysed the segregation of fluorescent foci as a function of cell size and of the presence of division septa, both indicators of progression of the cell cycle. Results are presented figure 6B for four representative loci,

the *ydeU*, *trg* and *ydgJ* loci located inside the FtsK high activity region and the *treA* locus located outside this region. As expected, the *ydeU*, *trg* and *ydgJ* loci showed equivalent segregation patterns and segregated in cells about to divide or dividing. In contrast, the *treA* locus displayed a clearly different pattern and segregated earlier, mostly in non-dividing cells.

Discussion

The results reported here show that a specific region of the *E. coli* chromosome is dedicated to the last steps of chromosome segregation and to their coupling to cell division via the action of the FtsK protein. This region is subjected to higher frequencies of processing by the division septum-associated FtsK DNA translocase than the rest of the chromosome. Consistent with this, segregation of this FtsK high activity region is delayed compared with that of its adjacent regions. This indicates that it stays longer in the midcell zone where the growing division septum allows activation of FtsK_C activities. Notably, the preferential action of

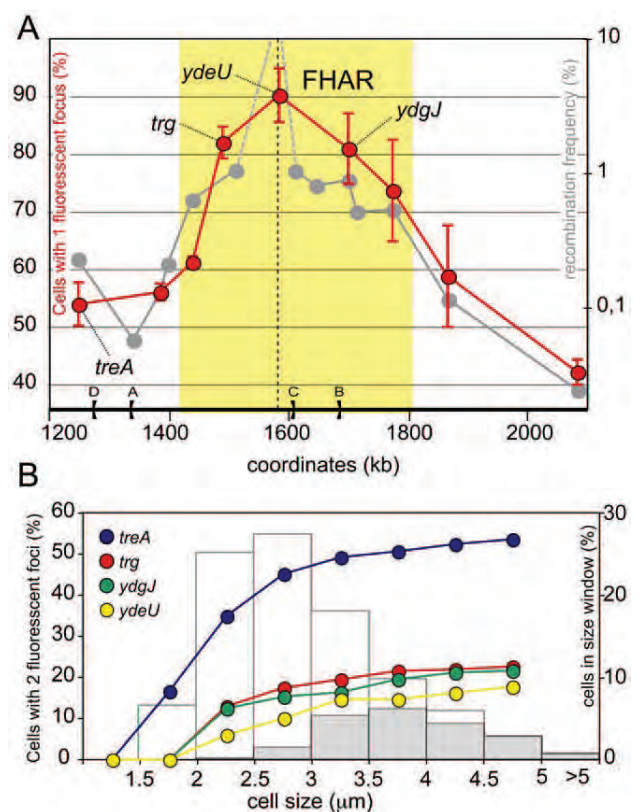


Figure 6. Delayed segregation of the FtsK high activity region.

(A) Strains carrying a *parS* insertion at chosen loci and producing the GFP- Δ 30ParB protein were observed under the microscope and the ratio of cells with 1 fluorescent focus on total cells was calculated (left dots; left Y-axis; Materials and methods). The means of at least 3 independent measures with standard deviation are plotted ($n > 250$ cells for each measure). The grey curve and yellow zone are redrawn from Figure 2 for comparison, omitting the *dif* natural position (right Y-axis). The dotted line indicates the natural *dif* position. (B) Data from (A) were sampled in cell size windows (0.5 μ m each, X-axis) and the fraction of cells with 2 segregated fluorescent foci was plotted (left Y-axis) for the four representative loci indicated. The distributions of cells in the same cell size windows is shown as histograms (right Y-axis). Open bars: total cells; Grey bars: cells harbouring a constricting division septum. doi:10.1371/journal.pone.0022164.g006

FtsK this region depends neither on where replication terminates nor on the KOPS-reading activity of FtsK. These results have implications for both the way FtsK interacts with and processes the *E. coli* chromosome and the segregation of the *ter* region.

Interaction of FtsK with the chromosome

We assayed the interaction of FtsK with the chromosome by scoring recombination between two *dif* sites inserted in direct repeat at chosen loci. This assay measures a physical interaction between FtsK and the assayed locus since XerCD/*dif* recombination requires direct interaction between XerD and the FtsK γ subdomain [24,32]. In addition, we recently reported that FtsK γ can induce XerCD/*dif* recombination when produced in the absence of the FtsK $\alpha\beta$ translocation motor [33], raising the possibility that our assay measures FtsK γ -XerD interactions in the absence of translocation. We however ruled out this possibility by showing that the FtsK_{ATP} protein, which contains an intact FtsK γ subdomain but is unable to translocate DNA, did not induce recombination in any region of the chromosome. Consistent with this observation, purified FtsK_C activates XerCD/*dif* recombination in vitro only in the presence of ATP and if one of the *dif*-carrying DNA substrates is long enough for FtsK to bind to it and translocate [28,30,49,50]. It follows that although FtsK γ alone can induce recombination, its activity is restricted to translocating FtsK hexamers when linked to the FtsK $\alpha\beta$ motor. We conclude that our assay measures the ability of FtsK to translocate DNA at the different loci assayed.

FtsK is associated with the cell division septum via its N-terminal domain, FtsK_N [Yu, 1998; Wang, 1998]. Although required for the resolution of chromosome dimers [33,51], this tethering is not necessary for induction of XerCD/*dif* recombination since production of FtsK_C detached from FtsK_N induces XerCD/*dif* recombination [52]. In contrast to wt FtsK, FtsK_C alone acts with similar efficiency in the different regions of the chromosome. This shows that the tethering of FtsK to the division septum acts to restrict FtsK activity to the terminal region. It follows that in wild type cells, most active FtsK is septum-associated.

The FtsK_C motor binds to any DNA in vitro but does so preferentially onto KOPS motifs [26,27,30]. The KOPS-recognition activity of FtsK is, however, not required for its preferential interaction with the FtsK high activity region since the FtsK_{KOPSblind} protein appears to translocate loci inside this region with the same efficiency as wt FtsK. Consistent with this observation, KOPS are over-represented and their orientation is biased all around the chromosome, and the density of KOPS is similar inside and outside the FtsK high activity region (one 5'-GGGNAGGG motif every ~12 kb). In addition, FtsK_C, which carries the KOPS recognition domain, has equal access to loci located inside and outside the FtsK high activity region when not tethered to the division septum. The preferential action of FtsK thus does not imply the FtsK-KOPS interaction. The position of a locus with respect to the terminal junction of KOPS polarity (i.e., the *dif* position in wt strains) is also unimportant for the activity of FtsK at this locus. This can be inferred from the fact that the low recombination frequencies observed at loci normally far from the KOPS junction in wt strains remain unchanged when these loci are close to this junction after deletion. These data also suggest that multiple internal elements rather than unique borders determine the FtsK high activity region.

Although the FtsK_{KOPSblind} protein shows the same activity as wt FtsK in the FtsK high activity region, its capacity to reach the *dif* natural position is affected, as indicated by the lower recombination frequency in the *ftsK_{KOPSblind}* mutant compared to wt at the *dif* locus and by the partial deficiency in chromosome dimer resolution of this mutant [31]. This indicates that KOPS are not required for the

preferential loading of FtsK in the FtsK high activity region but only for the orientation of subsequent translocation towards the *dif* position. Lastly, FtsK translocates loci located outside the FtsK high activity region at low but significant frequencies. This activity may be due either to rare active FtsK hexamers unlinked to the division septum or to a sporadic presence near the division septum of loci located outside the FtsK high activity region. In both cases, this may be linked to a role for FtsK independent of its roles in the last steps of segregation, for instance in replication or in the repair of broken chromosomes. Whatever this role, it depends strongly on the KOPS-recognition activity of FtsK since recombination frequencies at loci outside the FtsK high activity region requires this activity. This may explain why KOPS are over-represented and their orientation biased in all chromosome regions.

Segregation of the *ter* region

FtsK is recruited early to the division septum, at a time roughly corresponding to termination of replication [14,53]. It is however unable to induce XerCD/*dif* recombination at this time. FtsK-dependent recombination occurs later and appears to depend on constriction of the division septum [54,55]. Our results imply that, at the time of division, loci located inside the FtsK high activity region are more often located in the direct vicinity of the division septum than other loci. This is consistent with current models for segregation of the *E. coli* chromosome in which the *ter* loci are replicated in the mid-cell region and tends to keep this central position until septum constriction [43,44,45,46,53,56,57]. Using direct visualisation of the sub-cellular localisation of different *ter* loci, we have shown that this phenomenon is enhanced for loci located inside the FtsK high activity region compared to loci of its neighbouring regions. Indeed, the fraction of cells harbouring a single fluorescent focus of a tagged locus is enhanced inside the FtsK high activity region. Importantly, these different segregation patterns are not attributable to the replication timing of loci. For instance, two loci located 100 kb apart are predicted to be replicated within less than two min. by a single replication fork, which would alter the fraction of single-focus cells less than 2% in the growth conditions we used. Alternatively, the delayed segregation of the FtsK high activity region might be due to delayed or slower replication of this chromosome region. However, studies of the replication timing of *ter* loci militate against a significantly delayed replication of loci inside this region (for instance, the TerC locus [58]). The increase of the single-focus cell fraction for loci inside the FtsK high activity region is thus not due to delayed replication but rather to a slower post-replicative segregation of this region compared to its neighbouring regions. Consistent with this conclusion, a displacement of replication termination outside the FtsK high activity region does not modify its preferential processing by FtsK. Delayed segregation implies that the FtsK high activity region stays longer in the vicinity of the division septum than other chromosome regions. This proximity creates a preferential substrate for FtsK, which thus interacts efficiently with this region even when devoid of its KOPS-recognition activity. On the other hand, the FtsK high activity region may exclude other chromosome regions from the septum vicinity, which would explain their rare interaction with FtsK and its strict requirement for the KOPS-recognition activity.

What is the basis of the delayed segregation of the FtsK high activity region? Since FtsK is attached to the septum, its interaction with this region may result in delayed segregation. In this view, FtsK would interact with sister chromosome irrespective of their monomeric or dimeric state, which appears contradictory with the dependency of XerCD/*dif* recombination on RecA [59]. In addition, the presence of KOPS all around the chromosome and the fact that

FtsK_C detached from the septum shows no regional preference suggest that the regional preference is not a property of FtsK by itself. We thus favour the hypothesis that the preferred interaction of FtsK with the FtsK high activity region is a consequence rather than the cause of the delayed segregation. An obvious candidate is the activity of the MatP protein. Although its role is poorly understood, MatP binds specific sites, *matS*, which are found only in the *ter* region and delay its segregation [60]. MatP may thus act to create a proper substrate for FtsK activity into the FtsK high activity region. However, the region containing *matS* sites (from 1135 to 1914) is longer than this region. Another candidate is the persistence of intercatenation links (catenanes) between sister chromosomes. The fact that FtsK appears to be involved in the removal of catenanes argues in favour of this hypothesis. FtsK controls the activity of TopoIV in vitro [21,22]. Consistent with this observation, TopoIV acts preferentially in the vicinity of the *dif* site [61] and at a late stage of the cell cycle [62]. In addition, in the absence of active TopoIV, XerCD/*dif* recombination can remove catenanes provided FtsK promotes oriented translocation, suggesting that FtsK can control the location of catenation links [63]. Taken together, these data suggest that the removal of catenanes between sister *ter* regions is concomitant with FtsK activity. It follows that catenanes may form or persist preferentially between sister FtsK high activity region and so delay segregation. Clearly, the interplay between FtsK, MatP and TopoIV activities needs to be unravelled if we are to understand the segregation of the *ter* region and its integration in the cell cycle.

Materials and Methods

Strains and plasmids

Strains are derived from *E. coli* K12 strain LN2666 (W1485 F⁻ *leu* *thyA* *thi* *deoB* or *C supE rpsL* (StR) [64]. The *dif-lacI-dif* [33] and *parS*-Kn cassette [48] were cloned into the *EcoRV* site of plasmid pFC68 [36] to yield plasmid pCP26 and inserted into chromosome-borne Tn10 or Tc fragments as previously described [36]. The $\Delta(1364-1589)::Tc$, $\Delta(1387-1391)::psrA^*-Ap$ [39]; $\Delta(ftsK_{LC})$ -Kn, *ftsK_{ATP}*-Cm [15], $\Delta(ftsK_{\gamma})$ -Cm, *ftsK_{KOP}*-Cm [31], and $\Delta(xerC)::Gm$ [52] mutations were transferred by P1 transduction. XerC was produced from plasmid pFC241 (pGB2-*araBADp-xerC*) [33]. FtsK_C was produced from plasmid pFX150 (pBAD24-*ftsK_{50C}*) [19]. The GFP- Δ 30ParB protein was produced from plasmid pALA2705 [56].

XerCD/*dif* recombination assay

Strains carrying the $\Delta(dif)_{58}$ [65] and *xerC::Gm* mutations, an insertion of the *dif-lacI-dif* cassette and eventually plasmid pFX150

(FtsK_C) were grown in L-broth or L-broth plus ampicilin and 0.03% arabinose, rendered competent, and transformed with pFC241 (XerC). Transformants were plated on LB-agar containing 20 μ g/ml spectinomycin plus 100 μ g/ml ampicilin and 0,025% arabinose when required (pFX150) and grown overnight at 37°C. Five independent transformants were inoculated in the same medium, grown for 5 hours, diluted and plated on L broth plus X-gal (40 μ g/ml). The whole procedure corresponds to 20 generations before plating on L-Xgal. The ratio of dark blue to total colonies was used to calculate the frequency of *lacI* loss per generation [37]. The mean of the frequencies of *lacI* loss per generation and standard deviation of 5 independent measures is plotted in the figures.

Microscopy

Strains carrying a *parS*-Kn insertion and plasmid pALA2705 were grown in M9 medium (0.2% casamino acids, 0.2% glucose; 2 μ g/ml thiamine; 20 μ g/ml leucine; 20 μ g/ml thymine and 100 μ g/ml ampicilin) at 30°C to OD₆₀₀ = 0,3 (doubling time ~90 min.). No inducer (IPTG) was added to keep GFP- Δ 30ParB production as low as possible. Cells were plated on poly-L lysine slides, and observed using a Leica DMR-B microscope and a Roper CoolsnapES camera. Images were recorded and processed using Metamorph or ImageJ software.

Supporting Information

Figure S1 Micrographs of cells with GFP- Δ 30ParB/*parS* foci. Strains carrying plasmid pALA2705 and *parS* insertions at the indicated locus were grown and micrographed as indicated in Materials and Methods.

(PDF)

Acknowledgments

We thank David Lane and Ian Grainge for critical reading, Philippe Rousseau for helpful discussion and François-Xavier Barre and Olivier Espeli for the gift of strains.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: FC BH. Performed the experiments: MD CP MS HC RM CL. Analyzed the data: FC MD CP J-CM BH. Contributed reagents/materials/analysis tools: J-CM BH. Wrote the paper: FC.

References

- Rocha EP (2008) The organization of the bacterial genome. *Annu Rev Genet* 42: 211–233.
- Reyes-Lamothe R, Wang X, Sherratt D (2008) Escherichia coli and its chromosome. *Trends Microbiol* 16: 238–245.
- Toro E, Shapiro L (2010) Bacterial chromosome organization and segregation. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2: a000349.
- Espeli O, Mariani K (2004) Untangling intracellular DNA topology. *Mol Microbiol* 52: 925–931.
- Lesterlin C, Barre F, Cornet F (2004) Genetic recombination and the cell cycle: what we have learned from chromosome dimers. *Molecular Microbiology* 54: 1151–1160.
- Wang SC, West L, Shapiro L (2006) The bifunctional FtsK protein mediates chromosome partitioning and cell division in Caulobacter. *J Bacteriol* 188: 1497–1508.
- Le Bourgeois P, Bugarel M, Campo N, Daveran-Mingot M, Labonte J, et al. (2007) The unconventional xer recombination machinery of Streptococci/ Lactococci. *Plos Genetics* 3: 1190–1199.
- Val M, Kennedy S, El Karoui M, Bonn e L, Chevalier F, et al. (2008) FtsK-dependent dimer resolution on multiple chromosomes in the pathogen *Vibrio cholerae*. *PLoS Genet* 4: e1000201.
- Wu L (2009) It takes two DNA translocases to untangle chromosomes from the division septum. *Mol Microbiol* 74: 773–776.
- Kaimer C, Gonz alez-Pastor J, Graumann P (2009) SpoIIIE and a novel type of DNA translocase, SftA, couple chromosome segregation with cell division in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* 74: 810–825.
- Bigot S, Sivanathan V, Possoz C, Barre F, Cornet F (2007) FtsK, a literate chromosome segregation machine. *Molecular Microbiology* 64: 1434–1441.
- Sherratt DJ, Arciszewska LK, Crozat E, Graham JE, Grainge I (2010) The Escherichia coli DNA translocase FtsK. *Biochem Soc Trans* 38: 395–398.
- Yu XC, Tran AH, Sun Q, Margolin W (1998) Localization of cell division protein FtsK to the Escherichia coli septum and identification of a potential N-terminal targeting domain. *J Bacteriol* 180: 1296–1304.
- Wang L, Lutkenhaus J (1998) FtsK is an essential cell division protein that is localized to the septum and induced as part of the SOS response. *Mol Microbiol* 29: 731–740.
- Bigot S, Corre J, Louarn J, Cornet F, Barre F (2004) FtsK activities in Xer recombination, DNA mobilization and cell division involve overlapping and separate domains of the protein. *Molecular Microbiology* 54: 876–886.
- Grenga L, Luzzi G, Paolozzi L, Ghelardini P (2008) The Escherichia coli FtsK functional domains involved in its interaction with its divisome protein partners. *FEMS Microbiol Lett* 287: 163–167.
- Dubarry N, Barre F (2010) Fully efficient chromosome dimer resolution in Escherichia coli cells lacking the integral membrane domain of FtsK. *EMBO J* 29: 597–605.

18. Dubarry N, Possoz C, Barre FX (2010) Multiple regions along the *Escherichia coli* FtsK protein are implicated in cell division. *Mol Microbiol* 78: 1088–1100.
19. Aussel L, Barre F, Aroyo M, Stasiak A, Stasiak A, et al. (2002) FtsK Is a DNA motor protein that activates chromosome dimer resolution by switching the catalytic state of the XerC and XerD recombinases. *Cell* 108: 195–205.
20. Massey T, Mercogliano C, Yates J, Sherratt D, Löwe J (2006) Double-stranded DNA translocation: structure and mechanism of hexameric FtsK. *Mol Cell* 23: 457–469.
21. Espeli O, Lee C, Mariani K (2003) A physical and functional interaction between *Escherichia coli* FtsK and topoisomerase IV. *J Biol Chem* 278: 44639–44644.
22. Bigot S, Mariani KJ (2010) DNA chirality-dependent stimulation of topoisomerase IV activity by the C-terminal AAA+ domain of FtsK. *Nucleic Acids Res* 38: 3031–3040.
23. Sivanathan V, Allen M, de Bekker C, Baker R, Arciszewska L, et al. (2006) The FtsK gamma domain directs oriented DNA translocation by interacting with KOPS. *Nat Struct Mol Biol* 13: 965–972.
24. Yates J, Aroyo M, Sherratt D, Barre F (2003) Species specificity in the activation of Xer recombination at dif by FtsK. *Mol Microbiol* 49: 241–249.
25. Ptacin J, Nöllmann M, Bustamante C, Cozzarelli N (2006) Identification of the FtsK sequence-recognition domain. *Nat Struct Mol Biol* 13: 1023–1025.
26. Löwe J, Ellonen A, Allen M, Atkinson C, Sherratt D, et al. (2008) Molecular mechanism of sequence-directed DNA loading and translocation by FtsK. *Mol Cell* 31: 498–509.
27. Graham JE, Sherratt DJ, Szczelkun MD (2010) Sequence-specific assembly of FtsK hexamers establishes directional translocation on DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 20263–20268.
28. Bigot S, Saleh O, Lesterlin C, Pages C, El Karoui M, et al. (2005) KOPS: DNA motifs that control *E. coli* chromosome segregation by orienting the FtsK translocase. *Embo Journal* 24: 3770–3780.
29. Levy O, Ptacin J, Pease P, Gore J, Eisen M, et al. (2005) Identification of oligonucleotide sequences that direct the movement of the *Escherichia coli* FtsK translocase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 17618–17623.
30. Bigot S, Saleh O, Cornet F, Allemand J, Barre F (2006) Oriented loading of FtsK on KOPS. *Nature Structural & Molecular Biology* 13: 1026–1028.
31. Sivanathan V, Emerson J, Pages C, Cornet F, Sherratt D, et al. (2009) KOPS-guided DNA translocation by FtsK safeguards *Escherichia coli* chromosome segregation. *Molecular Microbiology* 71: 1031–1042.
32. Yates J, Zhekov I, Baker R, Eklund B, Sherratt D, et al. (2006) Dissection of a functional interaction between the DNA translocase, FtsK, and the XerD recombinase. *Mol Microbiol* 59: 1754–1766.
33. Nolisov S, Pages C, Rousseau P, Le Bourgeois P, Cornet F (2010) Are two better than one? Analysis of an FtsK/Xer recombination system that uses a single recombinase. *Nucleic Acids Research* 38: 6477–6489.
34. Grainge I, Lesterlin C, Sherratt DJ (2011) Activation of XerCD-dif recombination by the FtsK DNA translocase. *Nucleic Acids Res*. DOI 10.1093/nar/gkr078.
35. Corre J, Louarn J (2005) Extent of the activity domain and possible roles of FtsK in the *Escherichia coli* chromosome terminus. *Molecular Microbiology* 56: 1539–1548.
36. Cornet F, Louarn J, Patte J, Louarn J (1996) Restriction of the activity of the recombination site dif to a small zone of the *Escherichia coli* chromosome. *Genes Dev* 10: 1152–1161.
37. Perals K, Cornet F, Merlet Y, Delon I, Louarn J (2000) Functional polarization of the *Escherichia coli* chromosome terminus: the dif site acts in chromosome dimer resolution only when located between long stretches of opposite polarity. *Molecular Microbiology* 36: 33–43.
38. Graham JE, Sivanathan V, Sherratt DJ, Arciszewska LK (2010) FtsK translocation on DNA stops at XerCD-dif. *Nucleic Acids Res* 38: 72–81.
39. Louarn J, Cornet F, François V, Patte J, Louarn J (1994) Hyperrecombination in the terminus region of the *Escherichia coli* chromosome: possible relation to nucleoid organization. *J Bacteriol* 176: 7524–7531.
40. Duggin IG, Bell SD (2009) Termination structures in the *Escherichia coli* chromosome replication fork trap. *J Mol Biol* 387: 532–539.
41. Henson J, Kuempel P (1985) Deletion of the terminus region (340 kilobase pairs of DNA) from the chromosome of *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82: 3766–3770.
42. Hashimoto M, Ichimura T, Mizoguchi H, Tanaka K, Fujimitsu K, et al. (2005) Cell size and nucleoid organization of engineered *Escherichia coli* cells with a reduced genome. *Mol Microbiol* 55: 137–149.
43. Niki H, Yamaichi Y, Hiraga S (2000) Dynamic organization of chromosomal DNA in *Escherichia coli*. *Genes Dev* 14: 212–223.
44. Bates D, Kleckner N (2005) Chromosome and replisome dynamics in *E. coli*: loss of sister cohesion triggers global chromosome movement and mediates chromosome segregation. *Cell* 121: 899–911.
45. Wang X, Liu X, Possoz C, Sherratt D (2006) The two *Escherichia coli* chromosome arms locate to separate cell halves. *Genes Dev* 20: 1727–1731.
46. Espeli O, Mercier R, Boccard F (2008) DNA dynamics vary according to macrodomain topography in the *E. coli* chromosome. *Mol Microbiol* 68: 1418–1427.
47. Li Y, Austin S (2002) The P1 plasmid is segregated to daughter cells by a ‘capture and ejection’ mechanism coordinated with *Escherichia coli* cell division. *Mol Microbiol* 46: 63–74.
48. Nielsen H, Li Y, Youngren B, Hansen F, Austin S (2006) Progressive segregation of the *Escherichia coli* chromosome. *Mol Microbiol* 61: 383–393.
49. Massey T, Aussel L, Barre F, Sherratt D (2004) Asymmetric activation of Xer site-specific recombination by FtsK. *EMBO Rep* 5: 399–404.
50. Bonnè L, Bigot S, Chevalier F, Allemand J, Barre F (2009) Asymmetric DNA requirements in Xer recombination activation by FtsK. *Nucleic Acids Res* 37: 2371–2380.
51. Perals K, Capioux H, Vincourt J, Louarn J, Sherratt D, et al. (2001) Interplay between recombination, cell division and chromosome structure during chromosome dimer resolution in *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology* 39: 904–913.
52. Barre F, Aroyo M, Colloms S, Helfrich A, Cornet F, et al. (2000) FtsK functions in the processing of a Holliday junction intermediate during bacterial chromosome segregation. *Genes Dev* 14: 2976–2988.
53. Wang X, Possoz C, Sherratt D (2005) Dancing around the divisome: asymmetric chromosome segregation in *Escherichia coli*. *Genes Dev* 19: 2367–2377.
54. Steiner W, Kuempel P (1998) Cell division is required for resolution of dimer chromosomes at the dif locus of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 27: 257–268.
55. Kennedy S, Chevalier F, Barre F (2008) Delayed activation of Xer recombination at dif by FtsK during septum assembly in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 68: 1018–1028.
56. Li Y, Youngren B, Sergueev K, Austin S (2003) Segregation of the *Escherichia coli* chromosome terminus. *Mol Microbiol* 50: 825–834.
57. Lau I, Filipe S, Soballe B, Økstad O, Barre F, et al. (2003) Spatial and temporal organization of replicating *Escherichia coli* chromosomes. *Mol Microbiol* 49: 731–743.
58. Joshi MC, Bourmiquel A, Fisher J, Ho BT, Magnan D, et al. (2011) *Escherichia coli* sister chromosome separation includes an abrupt global transition with concomitant release of late-splitting intersister snaps. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108: 2765–2770.
59. Perals K, Capioux H, Vincourt J, Louarn J, Sherratt D, et al. (2001) Interplay between recombination, cell division and chromosome structure during chromosome dimer resolution in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 39: 904–913.
60. Mercier R, Petit M, Schbath S, Robin S, El Karoui M, et al. (2008) The MatP/matS site-specific system organizes the terminus region of the *E. coli* chromosome into a macrodomain. *Cell* 135: 475–485.
61. Hojgaard A, Szerlong H, Tabor C, Kuempel P (1999) Norfloxacin-induced DNA cleavage occurs at the dif resolvase locus in *Escherichia coli* and is the result of interaction with topoisomerase IV. *Mol Microbiol* 33: 1027–1036.
62. Espeli O, Levine C, Hassing H, Mariani K (2003) Temporal regulation of topoisomerase IV activity in *E. coli*. *Mol Cell* 11: 189–201.
63. Grainge I, Bregu M, Vazquez M, Sivanathan V, Ip S, et al. (2007) Unlinking chromosome catenanes in vivo by site-specific recombination. *EMBO J* 26: 4228–4238.
64. Cornet F, Mortier I, Patte J, Louarn J (1994) Plasmid pSC101 harbors a recombination site, psi, which is able to resolve plasmid multimers and to substitute for the analogous chromosomal *Escherichia coli* site dif. *J Bacteriol* 176: 3188–3195.
65. Capioux H, Lesterlin C, Perals K, Louarn J, Cornet F (2002) A dual role for the FtsK protein in *Escherichia coli* chromosome segregation. *EMBO Rep* 3: 532–536.

Annexe II

RESEARCH ARTICLE

Open Access

The terminal region of the *E. coli* chromosome localises at the periphery of the nucleoid

Jean-Christophe Meile^{1,2}, Romain Mercier^{1,2,3}, Mathieu Stouf^{1,2}, Carine Pages^{1,2}, Jean-Yves Bouet^{1,2*}, François Cornet^{1,2*}

Abstract

Background: Bacterial chromosomes are organised into a compact and dynamic structures termed nucleoids. Cytological studies in model rod-shaped bacteria show that the different regions of the chromosome display distinct and specific sub-cellular positioning and choreographies during the course of the cell cycle. The localisation of chromosome loci along the length of the cell has been described. However, positioning of loci across the width of the cell has not been determined.

Results: Here, we show that it is possible to assess the mean positioning of chromosomal loci across the width of the cell using two-dimension images from wide-field fluorescence microscopy. Observed apparent distributions of fluorescent-tagged loci of the *E. coli* chromosome along the cell diameter were compared with simulated distributions calculated using a range of cell width positioning models. Using this method, we detected the migration of chromosome loci towards the cell periphery induced by production of the bacteriophage T4 Ndd protein. In the absence of Ndd production, loci outside the replication terminus were located either randomly along the nucleoid width or towards the cell centre whereas loci inside the replication terminus were located at the periphery of the nucleoid in contrast to other loci.

Conclusions: Our approach allows to reliably observing the positioning of chromosome loci along the width of *E. coli* cells. The terminal region of the chromosome is preferentially located at the periphery of the nucleoid consistent with its specific roles in chromosome organisation and dynamics.

Background

Bacterial genomes appear as compact DNA masses, termed nucleoids, located centrally along both the length and width of the cells [1]. Nucleoids are highly organised structures within which each chromosome region occupies specific locations along the length of the cell and displays a distinct choreography during the cell cycle (for reviews: [2,3]). In most bacteria, nucleoids contain a single chromosome replicated from a single origin. This defines two oppositely oriented replichores, each extending from the replication origin, *oriC* to the terminal (*ter*) region, oppositely located on circular chromosomes. This replicative organisation has important consequences for the global organisation and

segregation of bacterial nucleoids. In *E. coli*, replication occurs around the cell centre (i.e., the mid-cell position) [4]. Segregation is concomitant with replication so that replicated loci are segregated from mid-cell to the equivalent positions in the future daughter cells (the quarter positions) following the order of their replication [5-9]. The *oriC* region (*ori*) is thus the first to segregate, and the *ter* region the last. In newborn cells, loci of the *ter* region are located close to the new cell pole (polar positioning) and migrate towards the midcell during the replication process.

Recent advances in bacterial cell cytology allow a general model of the *E. coli* nucleoid structure to be established. The *ori* region, located towards midcell, migrates to the quarter positions after being duplicated. The two replichores occupy distinct locations on each side of *ori* with chromosome loci recapitulating the *ori-ter* genetic map along the cell length axis [7,10,11]. In this model, the *ter* region is inferred to contain a stretched region

* Correspondence: jean-yves.bouet@ibcg.biotoul.fr; Francois.Cornet@ibcg.biotoul.fr

¹Université de Toulouse; Université Paul Sabatier; Laboratoire de Microbiologie et Génétique Moléculaires; F-31000 Toulouse; France
Full list of author information is available at the end of the article

linking the two nucleoid edges [12,13]. This linking region is believed to be composed of a segment of 50 kb randomly taken within the 400 kb *ter* region. Notably, the *ter* region is the site of specific activities involved in segregation [14,15]: in particular, it interacts with the MatP protein [16] and with the FtsK DNA translocase ([17]; our unpublished results).

In addition to this replicore organisation, the *E. coli* nucleoid appears to be structured into macrodomains (MDs). MDs are 0.5 to 1 Mb regions inferred to be self-compacted and composed of loci having similar intracellular positioning and dynamics during segregation [6,9,18]. The *E. coli* chromosome contains four MDs: the Ori and Ter MDs (containing *ori* and *ter*, respectively) and the Right and Left MDs flanking the Ter MD. The two regions flanking the Ori MD, called the non-structured regions (NS regions), do not display MD properties and contain loci displaying a higher intracellular mobility than MD-borne loci [9].

Most studies of the localization of chromosomal loci in bacteria have focused on their position along the length of the cell. We are not aware of any reported data concerning loci positioning across the width of the cell; this is partly because bacteria are too thin for accurate 3-D analysis, by for example confocal microscopy. We evaluated the position of *E. coli* chromosomal loci across the width of cells from statistical analysis of 2-D images. We observed the distributions of loci tagged with fluorescent proteins and compared them to simulated distributions from different cell width positioning models. Using this method, we detected different positioning patterns for different loci across the cell width. Loci in the *ori* region and Right MD appeared to position randomly across the nucleoid width. A locus in the NS-right region was preferentially located close to the cell centre, whereas a *ter*-borne loci localised at the nucleoid periphery. To validate these observations, we demonstrated that our method reliably detects the migration of individual loci, as part of the global migration of the nucleoid towards the cell periphery induced by production of the bacteriophage T4 Ndd protein.

Results

Positioning of chromosome loci in living cells

To label chromosomal *loci* such that their position could be determined, we used insertions of the *parS* site from the bacteriophage P1 and production of the YFP- Δ 30ParB fusion protein (Methods) [19,20]). The *parS* site was first inserted at four different loci located at 3909 kb (*ori*), 316 kb (*right*, inside the right MD), 738 kb (*NS-right*) and 1568 kb (*ter*) on the *E. coli* chromosome map (Figure 1A). The resulting strains showed equivalent growth rates and normal cell shape whether or not they produced the YFP- Δ 30ParB protein (doubling times in

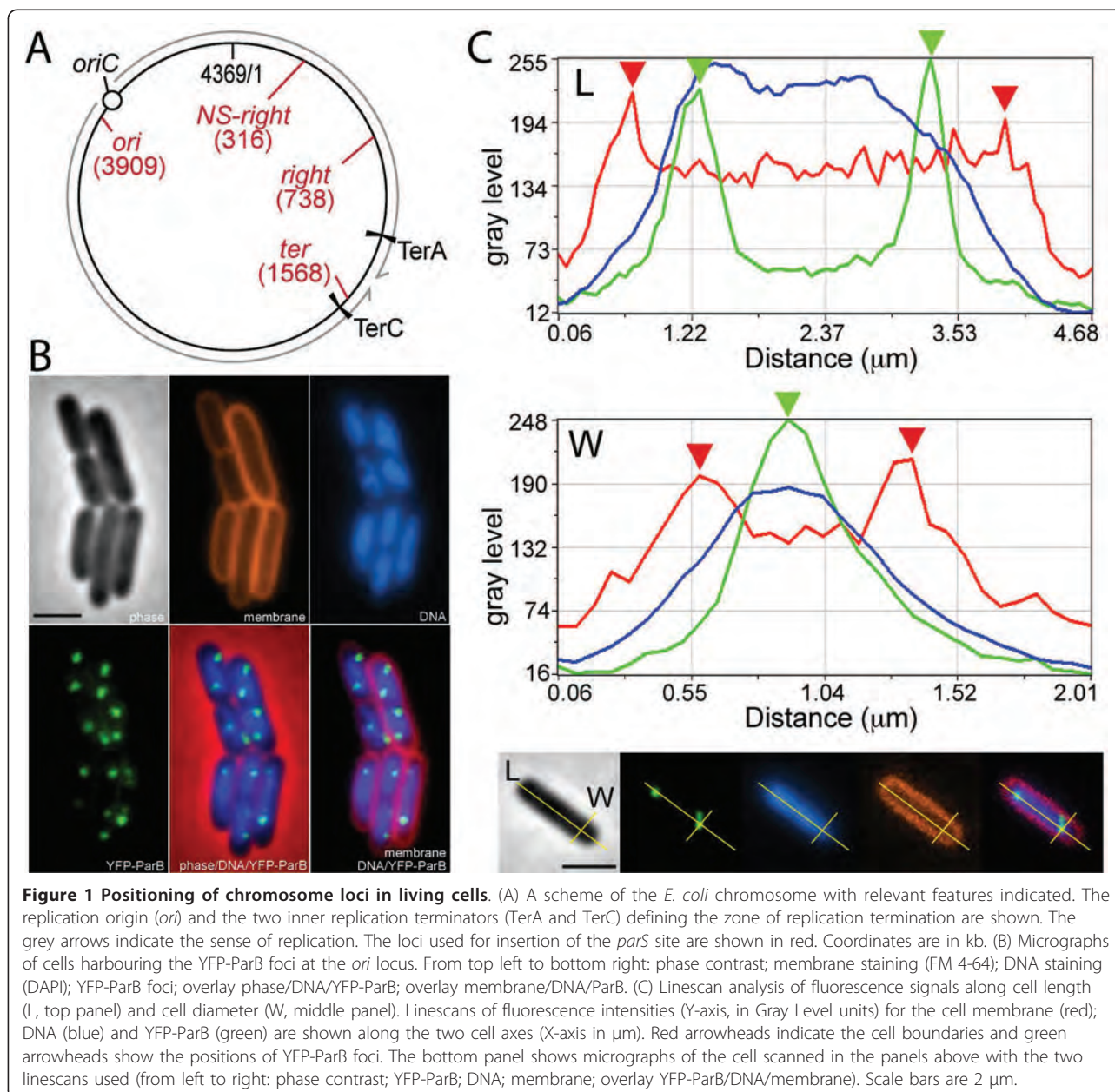
synthetic medium of 45 min. at 42°C and 70 min at 30°C).

Transient production of the YFP- Δ 30ParB protein allowed the visualisation of fluorescent foci in most cells (> 90%, Figure 1B and data not shown). Membrane and DNA dyes were used concomitantly to visualise the cell periphery and the nucleoid (Figure 1B and 1C). Cells were classified into populations defined according to their number of foci, and the positioning of foci along the length of cells was evaluated for each population (Figures 1C and 2). The distances of the foci to the closest cell pole were scored on a five points scale along the long axis of the cell from the pole to mid-cell (Additional file 1, Figure S1). The *ori*, *right* and *NS-right* loci displayed 2 to 4 foci that mostly found at or near the quarter positions, whereas the *ter* locus displayed 1 or 2 foci, which were mostly located at mid-cell (Additional file 1, Figure S1). The proportion of mid-cell-located *ter* foci was lower for cells harbouring a single focus than for cells with two foci, consistent with a progressive migration of the *ter* region from the new cell pole to the mid-cell during the cell cycle [7,8,21]. These findings are consistent with previous observations using similar [9,20] or different detection systems and growth conditions [6,10].

Positioning of chromosome loci along the cell diameter

The position of a fluorescent focus along the width of the cell cannot be directly determined using 2-D wide-field microscopy. Indeed, a focus located near the cell periphery may appear at the centre of the cell diameter or at the edge according to the orientation of the cell cylinder with respect to the focal plan. Nevertheless, since the orientations of the cell cylinder are expected to be random for a population of rod-shaped bacteria deposited on a plane surface, the mean position of particular foci can be calculated from the apparent distributions of foci along the cell diameter. We therefore measured the apparent distance along the cell diameter between foci and the membrane (Figure 1C). The datasets obtained were then compared with distributions calculated for different models of positioning across the width of the cell (Methods). We defined five slices of equivalent surface in a quarter of the cell section and calculated the expected distributions of foci according to the various models of positioning (the 2-D apparent foci distributions for various 3-D localisation patterns are shown in Figures 2, 3 and 4).

Again, cells were classified into major populations depending on the number of foci they contained. For *ori*, *right* and *NS-right* loci, the distributions of foci did not differ significantly between cell populations. Thus, there was no obvious correlation between positioning and cell cycle progression (Figure 2B and data not



shown). We therefore combined the datasets of the different classes into a single distribution (Figure 2C). The *ori* and *right* loci appeared to be similarly distributed into four axial sections, but were less frequently found in the most peripheral section (Figure 2C). Comparison of the observed and expected datasets using the χ^2 test showed that the distribution of the *ori* and *right* loci was significantly different from all simulated distributions except the 90% central model (Figure 2D; $\chi^2 = 2.7$ and 2.8, respectively; corresponding to p-values of 0.6). The 90% central model is consistent with the mean position of the nucleoid, which appears as a central DNA mass partly excluded from the extreme periphery

of the cell (Figure 1B). The *ori* and *right* loci thus appeared randomly positioned across the width of the nucleoid. The *NS-right* locus clearly tended to localise closer to the cell centre than the *ori* and *right* loci without being completely excluded from the cell periphery. However, we failed to find a model that corresponded to this distribution, the best p-value value obtained being 0.003 with the 80% central model (not shown).

In the case of the *ter* locus, only cell populations harbouring one or two foci were statistically relevant. In both populations, a large fraction of foci were located close to either the cell pole or the mid-cell position where the division septum forms (Additional file 1,

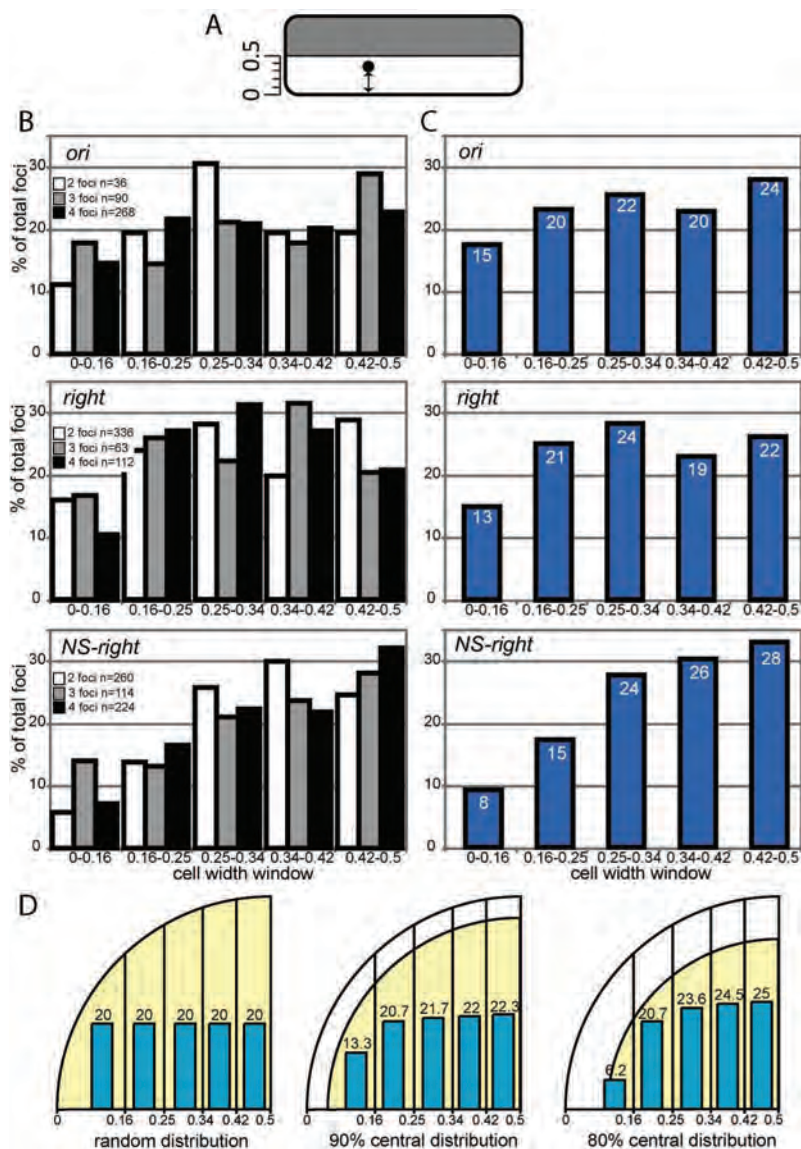


Figure 2 Distributions of foci along the cell diameter. (A) Drawing showing the measurement of the apparent positions of foci along the cell diameter. Distances along the cell diameter between the centres of foci and the nearest membrane were measured. (B) Distributions of foci along the cell diameter for the *ori*, *right* and *NS-right* loci in the various cell classes. Distributions are plotted as the percentage of total foci in each cell class (Y-axis). The sample size of the cell classes is given on each graph. The positions of foci were subdivided into five windows corresponding to cell slices of equivalent areas (from 0 at the cell periphery to 0.5 at the cell centre, X-axis). (C) Data from (B) were compiled into single distributions. The percentage of foci in each cell width window is given on the histograms. (D) Examples of simulated distributions. A quarter of a cell section is shown with five cell slices (X-axis). Yellow areas show areas of permitted localisation of foci for each model. The corresponding distributions of foci in the five cell width slices are shown as histograms with the corresponding percentage of total foci.

Figure S1). We thus excluded cells with an apparent constricting division septum from our analysis to avoid variations due to local deformation of the membrane. In contrast to other loci, the distribution of *ter* foci clearly differed between the two cell populations (p -value $< 10^{-3}$; Figure 3). The distribution of foci in cells with a single focus appeared more peripheral than random. Indeed, the distribution was significantly different from the

random and central models (p -value $< 10^{-3}$); the best fitting model was the 90% central 60% peripheral model in which foci are excluded from the 10% cell periphery and 40% cell centre regions (p -value = 0.1; Figure 3). Cells with two foci showed a distribution more central than random. It was however different from any simulated distribution (p -value < 0.05). This more central location is not due to local deformation of the membrane during

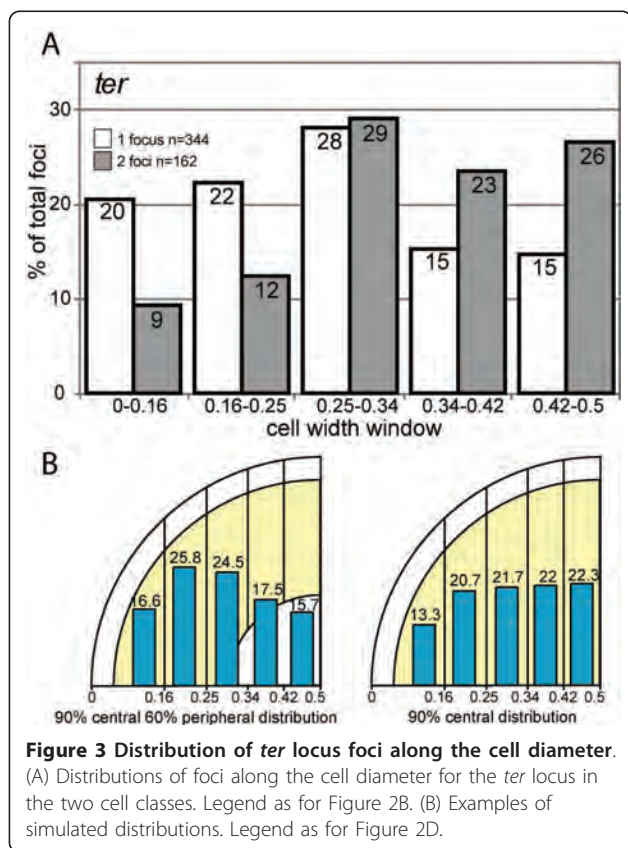


Figure 3 Distribution of *ter* locus foci along the cell diameter. (A) Distributions of foci along the cell diameter for the *ter* locus in the two cell classes. Legend as for Figure 2B. (B) Examples of simulated distributions. Legend as for Figure 2D.

constriction of the division septum since cells with a constricting septum were omitted from our analysis. The *ter* region is the last to be segregated, and consequently nucleoid segregation is almost completed when *ter* foci are duplicated [8]. It follows that duplicated *ter* foci located close to midcell lie at the mid-cell edge of the nucleoid. The distributions of foci of the *ter* locus in cells harbouring one or two foci thus indicates that the *ter* region is preferentially located at the periphery of the nucleoid, either close to the parietal membrane (in single foci cells) or close to a cell pole (after *ter* duplication) throughout cell cycle progression.

To rule out a specific behaviour of the *ter* locus used, we analysed a second *ter* locus located at 1490 kb (*trg*). The results reported in Additional file 1 Figure S5 clearly show that the *trg* locus also preferentially localises at the nucleoid periphery in the cell population harbouring a single fluorescent focus. This strongly suggests that the peripheral location is a general property of the terminal region of the chromosome.

Loci positioning after nucleoid disruption

We tested whether the same approach could detect a change in chromosome organisation. We used production of the Ndd (Nucleoid Disruption Determinant) protein from the T4 bacteriophage. Ndd disrupts the central and

compacted structure of the nucleoid in *E. coli* and causes chromosomal DNA to delocalise to the cell periphery [22-24]. A plasmid carrying a T7p-*ndd2*^{Ts} fusion was transferred into the strains carrying *parS* insertions, which express the T7 RNA polymerase (Methods). Strains containing the pT7-*ndd2*^{Ts} plasmid had a doubling time similar to the parental strains in the absence of Ndd production (45 min. at 42°C in M9 medium). Ndd2^{Ts} production was induced by a rapid temperature shift down to 30°C in the presence of IPTG (Methods). Ndd2^{Ts}-producing cells (hereafter called Ndd-treated cells) stopped dividing almost immediately and did not elongate more than 1 µm (not shown; [25]). The DNA was stained with DAPI and the cells examined by microscopy. Nucleoid disruption was observed after 15 min of induction and appeared to be complete in virtually all cells after 30 min. At this stage, the DAPI staining pattern was similar to the shape of the membrane, indicated that most of the cellular DNA was delocalised towards the cell periphery (Figure 4A and Additional file 1, Figure S2).

The number of foci per cell was lower in Ndd-treated than control cultures (Additional file 1, Figure S3). This suggests that Ndd prevents segregation of loci (see discussion). Fluorescent foci were nevertheless observed in most Ndd-treated cells and their size was indistinguishable from that of foci observed in control cells (Additional file 1, Figure S2 and data not shown), suggesting that Ndd does not affect the local structure or compaction of the DNA (see discussion).

We analysed the distribution of foci along the length of Ndd-treated cells (Additional file 1, Figure S4C). The *ori*, *right* and *NS-right* loci were more widely distributed in Ndd-treated than control cells and positioning at the quarter positions was lost or less accurate. A significant proportion of foci were close to the cell poles, consistent with migration of the DNA towards the periphery of the cell (Additional file 1, compare Figures S4C with S1). In contrast, the positioning of the *ter* locus was only slightly affected by Ndd (Additional file 1, Figure S4C): the pattern was generally unchanged although Ndd treatment was associated with mid-cell-located foci being frequent in both cell classes (1 and 2 foci) and pole-located foci more frequent in cells harbouring a single focus.

We next observed the distribution of foci along the cell diameter. We first analysed the cell classes independently and found no significant difference between their foci distribution (Additional file 1, Figure S4D). We thus used the total cell population as a single group for the subsequent analysis (Figure 4B). The distributions of the four loci along the cell diameter in Ndd-treated cells was very different from that in control cells (Figure 4): in Ndd-treated cells all loci appeared shifted towards the cell periphery (Figure 4B). Comparison with

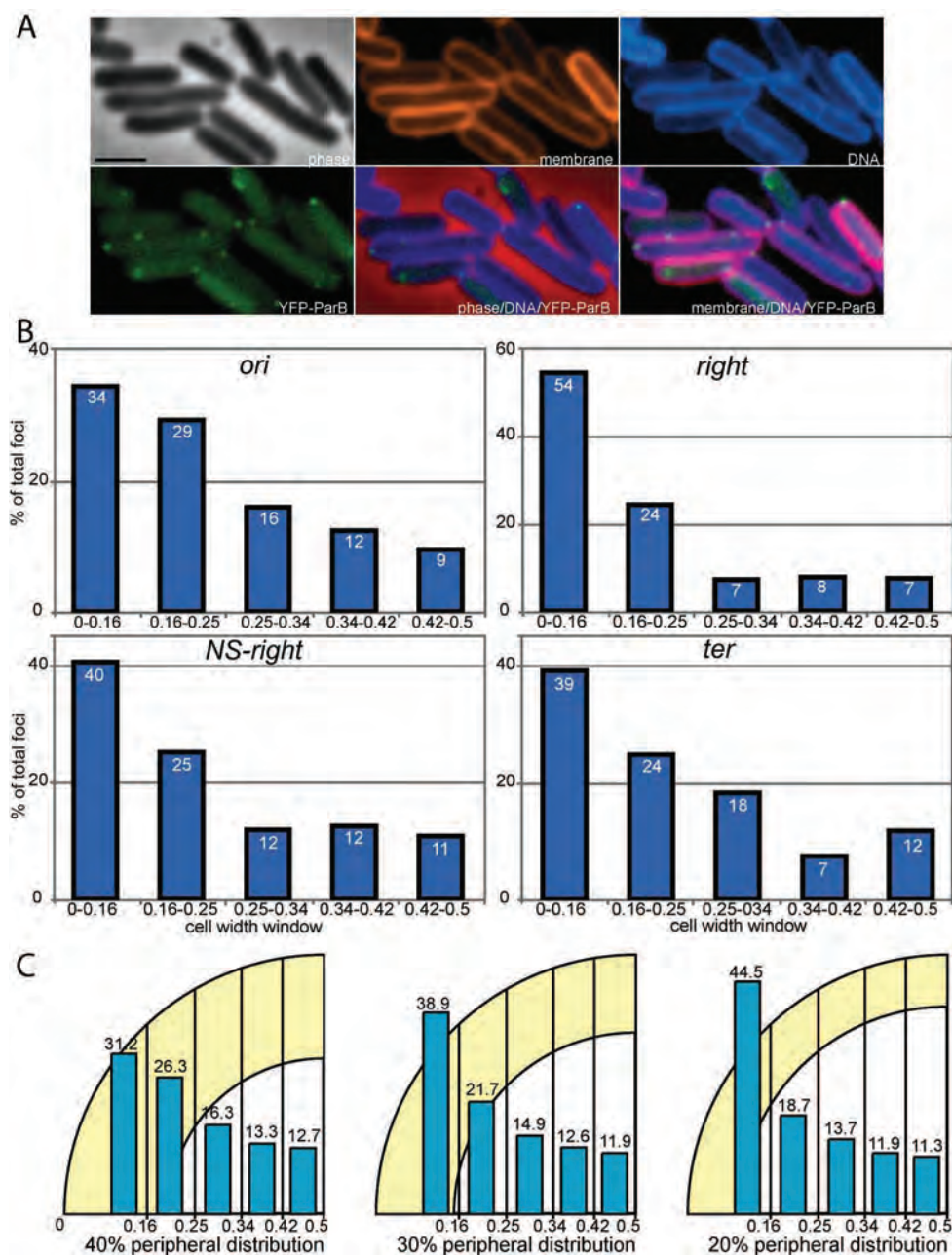


Figure 4 Distributions of foci along the cell diameter in Ndd-treated cells. (A) Micrographs of Ndd-treated cells showing the relocation of chromosomal DNA towards the cell periphery. Legend as for Figure 1B (*parS* site inserted at the *ori* locus). (B) Distributions of foci of the indicated loci along the cell diameter. Legend as for Figure 2C. (C) Legend as for Figure 2D.

simulated distributions showed that the observed distributions were consistent with the loci being excluded from the 60 to 80% centre part of the cell width (Figure 4C and not shown; p-values were lower than 0.05 with all models except the 20 to 40% peripheral models). We conclude that our analysis can detect modifications of the positioning of chromosome loci across the width of the cell, and this strengthens the validity of our findings

concerning positioning in the absence of Ndd production.

Correlation between loci positioning along cell length and width

Foci were sorted in ascending order of their distance to the closest pole (X-axis) and their position along the cell diameter was plotted (Y-axis, grey dots; Figure 5). No

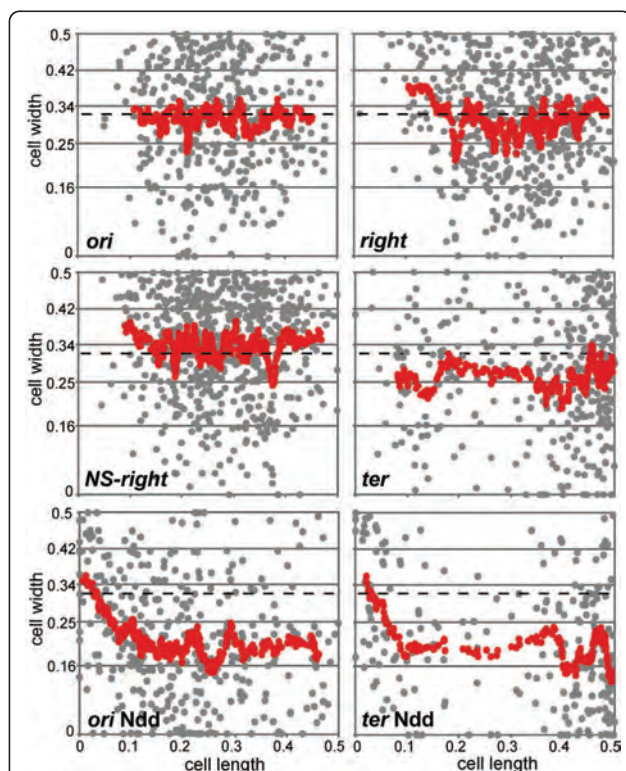


Figure 5 Analysis of correlation of the position of foci along the cell length with that along the cell diameter. Graphs show the positions of foci of four loci in wt and Ndd-treated cells, as indicated in each panel, along the cell diameter (Y-axis) as a function of their position along the cell length (X-axis). The grey dots are individual foci. The red dots are sliding means of twenty adjacent foci (with a step of one focus). For the *ori*, *right* and *NS-right* loci in Ndd-untreated cells and for the *ori* and *ter* loci in Ndd-treated cells, the data from the different cell classes were combined, as these dataset do not statistically differ (see Figure 2). In the case of the *ter* locus in Ndd-untreated cells, only the data from cells with a single focus are plotted. The dotted lines show the mean position of foci calculated from the 90% central model.

correlation appeared for any locus and calculated Pearson correlation coefficients were not significant (less than 0.05 in absolute value). The datasets of cell diameter position are *de facto* highly variable. Therefore, sliding means for 20 adjacent dots were calculated and plotted to help visualise patterns (red dots, Figure 5). Again no general relationship between position along one axis and position along the other could be established. Nevertheless the *ori* and *right* loci appeared to behave similarly and the *NS-right* locus tended to be closer than *ori* and *right* to the cell centre. The *ter* locus was more peripheral than other loci in cells with a single focus (red dots). The same analysis was performed for the *ori* and *ter* loci after Ndd treatment (Figure 5). For the *ter* locus, distributions of the two cell classes were combined since they were not significantly different (Additional file 1, Figure S4D). In both cases, the sliding mean was consistent with the peripheral

location of the loci. Equivalent patterns were obtained for the *right* and *NS-right* loci in Ndd-treated cells (not shown). Foci located in the 0-0.1 cell length slice were more central than the other foci. This cell length slice corresponds to the cell poles, where the membrane curvature modifies the cell width distribution of foci. This effect was detected only in Ndd-treated cells due to the enrichment of loci in this cell slice compared to control cells (Additional file 1, Figure S4C).

Discussion

We report that it is possible to assess the mean position of chromosome loci across the width of a rod-shaped bacterium using two-dimensional pictures. We recorded the apparent position of fluorescence-tagged chromosomal loci along the diameter of a large number of cells and compared the resulting distributions to simulated distributions calculated from different positioning models. We analysed five loci mapping in four different chromosomal regions that behave differently during the cell cycle. For these five loci, we detected three different patterns, showing that our method can detect differences in cell width localisation. The *ori* and *right* loci appeared randomly distributed through a cell volume corresponding to the nucleoid, whereas the *NS-right* locus was more central and *ter* loci more peripheral. Our method based on the analysis of individual loci successfully detected the general migration of chromosomal DNA towards the cell periphery provoked by the production of the Ndd protein. Indeed, in Ndd-producing cells, the four loci assayed were clearly distributed at the cell periphery. This observation validates the differences observed in the localisation of these loci in normal cells. This is, to our knowledge, the first successful attempt to localise the position of chromosome loci along the short axis of bacteria.

The method used here involves assessing mean distributions such that general tendencies of positioning across the cells can be assessed, rather than rapid or transient changes in position. Indeed, the possible movements of loci during replication, subsequent segregation or gene expression are likely to be too fast to affect significantly the distributions observed in this way. Loci may thus have transient preferential cell width localisations, for instance at the cell periphery during segregation of newly replicated DNA [26] or during gene expression [27,28], that our method would fail to detect.

The emerging view of the large-scale organisation of the *E. coli* nucleoid along the long axis of the cell is that it is organised from the *ori* region, with the left and right replichores recapitulating the genetic map on each side of *ori* and the *ter* region forming a less condensed region linking the two edges of the nucleoid [12,13]. The chromosome also contains four macrodomains: Ori,

Right, Left and Ter, that occupy distinct chromosome territories and two less structured regions (NS-right and left) that are less accurately positioned [9]. Our results have implications both the global replicore organisation and the macrodomain organisation of the chromosome. Loci located in the Ori and Right macrodomains (the *ori* and *right* loci) conformed to a random localisation model in the nucleoid width, suggesting that macrodomains do not occupy specific locations in the cell diameter. Thus, macrodomain territories only concern nucleoid length and not nucleoid layers along the width of the cell. The *NS-right* locus behaves differently from the macrodomain loci, suggesting that the different features of macrodomain and NS regions involve a different positioning along cell width. The more central than random localisation of the *NS-right* locus may appear contradictory with the higher mobility described for this chromosome region [9]. We would stress however that there is no obvious direct link between the mobility and the mean positioning of a chromosome locus. The NS-right locus may still move faster but in a more confined region in the cell width compared to loci located in macrodomains. The *ter* loci shown a particular localisation in cells with a single focus: they were more peripheral than other loci. Comparison with simulated models indicates that these loci are excluded from the cell centre. This peripheral location of *ter* is not restricted to any particular step of chromosome dynamics since it appears conserved for foci located from the pole to the middle of the cell (Figure 5 and Additional file 1, Figure S5). The *ter* region migrates from the new cell pole to the mid-cell position during chromosome replication [8,21]. This movement along the cell length occurs before *ter* replication (i.e., in cells with a single *ter* focus). Our results strongly support the view that the *ter* region migrates from the cell poles to mid-cell along the periphery of the nucleoid. This is also fully consistent with the notion that at least a part of the *ter* region connects the nucleoid edges via a peripheral link [12,13]. It will be interesting to investigate if this particular behaviour of the *ter* region is related to specific features of this region such as the presence of *matP* sites [16] or the action of the FtsK translocase.

We used the T4 Ndd protein to interfere with chromosome organisation. Production of Ndd causes the centrally positioned nucleoid to move to the cell periphery by an unknown mechanism [24]. Following Ndd production and consequent nucleoid disruption, foci were detected as efficiently as in control cells (Figure 4A), indicating that the delocalised DNA remained fully proficient for ParB binding and spreading over *parS* sites. Moreover, ParB binding to *parS* requires IHF, and IHF-ParB complexes strongly prefer supercoiled substrates [29]. Therefore, effective foci visualisation in our experiments involving rapid Ndd

action indicates that DNA supercoiling is not affected during Ndd-induced nucleoid delocalisation, consistent with previous observations during a slow Ndd disrupting process [24]. Ndd production reduced the number of foci per cell, particularly for the *ori*, *right* and *NS-right* loci (Additional file 1, Figure S3). This effect was less pronounced for the *ter* locus indicating that it is not primarily due to a defect in the detection of foci. Following Ndd production, cell division is stopped more rapidly than chromosome replication [24], so the reduction in the number of foci per cell cannot be due to a reduction of locus copy number. The smaller number of foci number may in part be due to the peripheral location of the chromosome in Ndd-treated cells. Indeed, the thickness of the peripheral DNA, as measured by DAPI staining, appeared to be in the same range as the optical resolution limit (about 200 nm, i.e., 3 pixels; see Additional file 1, Figure S2). Therefore, foci in close proximity inside disrupted nucleoids would appear as a single signal. Thus, the apparent reduction in the number of foci per cell strongly suggests that segregated sister loci are brought back together during nucleoid disruption. Chromosomal loci are therefore not completely free as they relocate toward the membrane during nucleoid disruption but conserve some positioning information. Consistent with this, the delocalisation of foci along the length of the cell is not complete in Ndd-treated cells, at least for the *ori*, *right* and *ter* loci (Additional file 1, Figure S4C). Interestingly, the *ori* locus tends to localise close to the cell poles in cells with disrupted nucleoids, whereas the *right* and *ter* loci localise towards midcell. This suggests that Ndd action changes the intracellular orientation of the chromosome. We conclude that Ndd affects functions that maintain the central compaction and the orientation of the chromosome without provoking a complete disorganisation of the chromosomal DNA.

Conclusions

We have developed an approach that allows to reliably observing the mean positioning of fluorescent objects along the width of rod-shaped bacterial cells from two-dimension images. We have successfully used this approach to study the positioning of *E. coli* chromosome loci and shown that loci of different chromosome region position differently along cell width. Most interestingly, loci of the terminal region of the chromosome are preferentially located at the periphery of the nucleoid consistent with the specific roles of this region in chromosome organisation and dynamics.

Methods

Strains and plasmids

Most strains used were derived from DLT812 (CB0129 Δ (*ara-leu*) *zac3051::Tn10* [30]), rendered lysogen for λ DE3 using the λ DE3 lysogenisation kit (Novagen), and *pcp18::*

araE, *FRT-Kn-FRT* by transduction to obtain DLT1886. The Kn resistance cassette was removed by transitory expression of Flp recombinase from pCP20 [31], yielding strain DLT1915. The *parS*-Kn cassette at positions 3909 kb (*ori*) and 1568 kb (*ter*), and the *parS-FRT-Cm-FRT* cassette at positions 316 kb (*NS-right*) and 738 kb (*right*) (see map Figure 1A) were transferred into DLT1915 from strains CC4711, CC4713 [19] and from strains carrying the NSR-3 and Right-3 [9] to yield strains FC542, FC543, FC541 and FC540, respectively. Insertion of the *parS-FRT-Cm-FRT* at the *trg* (1490 kb) locus of strain LN2666 (CB0129 *rpsL* (StR)) was obtained using standard transgenesis procedure with the λ red system [19]. Transformation by pCP20 was used to remove the Cm resistance gene. To obtain the Ndd-producing plasmid pRM7, a fragment carrying *lacI* and a pT7-*ndd2ts* fusion [25] was ligated as a *NruI-HindIII* fragment into pACYC184. Plasmid pBAD24-YFP Δ 30ParB was used to produce the YFP-ParB fusion (gift from O. Espeli).

Cell growth and microscopy

Strains carrying plasmids pBAD24-YFP Δ 30ParB, and either pACYC184 (Ndd untreated cells), pRM7 (Ndd-treated cells) or no second plasmid (LN2666 derivative), were grown overnight at 42°C (derivatives of DLT1915) or 30°C (derivative of LN2666) in M9 medium supplemented with 0.2% casamino acids, 0.4% glucose; 2 μ g/ml thiamine; 20 μ g/ml leucine, 20 μ g/ml thymine, 100 μ g/ml ampicillin and, when required, 10 μ g/ml chloramphenicol. These cultures were diluted 1/100 in the same medium and grown at the same temperature to an OD₆₀₀ of 0.5-0.6. In the case of DLT1915 derivatives, the temperature was rapidly decreased by mixing the cultures with an equal volume of cold M9 medium, supplemented with 1 mM IPTG and 0.1% arabinose, followed by incubation at 30°C for 15 min. In the case of the LN2666 derivative, 0.1% arabinose was added to the culture followed by incubation at 30°C for 15 min. The dyes DAPI and FM4-64 were added to the culture to label DNA and cell membranes, respectively, and the cultures incubated for a further 15 min. Aliquots of the culture were directly deposited on glass slides covered with a layer of 1% agarose containing M9 medium, and observed by phase-contrast and fluorescence microscopy using an inverted Olympus X81 microscope carrying a 100 \times oil-immersion Olympus lens (N.A. of 1.3) and a Roper CoolsnapHQ CCD camera. Images were acquired using Metamorph software.

Measurement of foci position

Using Metamorph software, images of cell membranes, YFP-ParB signals, DNA and phase-contrast were

artificially coloured in red, green and blue and merged. The Linescan function was used to analyze fluorescence signal intensities. Lines were drawn across the long and short axes of each cell and for each pixel of the lines, fluorescence intensities were measured for membrane (FM4-64, red), DNA (DAPI, blue) and YFP-ParB (green) signals. Data were plotted as intensity (grey level) vs. pixel distance along each line (Figure 1B). Along both axes, cell boundaries and the centre of YFP-ParB foci can be precisely determined as the positions of maximum intensity of the fluorescence signals (red and green arrowheads, respectively, in Figure 1B). Data were collected and calculated using Excel software. Apparent distances between the foci and the membrane were always measured to the closest pole (cell length) or parietal membrane (cell width) and the obtained values are reported as ratios relative the total cell length or diameter, respectively, such that the values are necessarily between 0 and 0.5. Cells were classified into populations according to the number of foci they contain. Cell length values were sampled into five cell slices of equal length. For cell diameter slices, we considered the *E. coli* cell to be a cylinder, and its transversal section a circle. The apparent distance of foci to the closest parietal membrane was then considered as its projection on the circle radius. The circle quarter was divided into five slices of equal area and the measured positions of foci along the transversal section were classified into these slices. The measured cell diameter was 0.89 \pm 0.12 μ m on average (428 cells), corresponding to slices ranging from 0.14 μ m (for the most peripheral) to 0.07 μ m (for the most central). If foci were randomly positioned along the cell width, they would be expected to be evenly distributed among the cell slices.

Calculation of models and statistical analysis of datasets

To construct models of positioning across the width of the cell, we first reasoned that in the case of random positioning, the probability of finding a focus in a given cell slice is proportional only to the area of this slice (i.e., 20% in the case of five slices of equal areas). We then considered different theoretical distributions for foci between slices if excluded from increasing percentages (with 10% steps) of the cell periphery and/or the cell centre by subtracting circle areas (examples are shown in Figure 2, 3 and 4). Observed distributions were compared to calculated distributions using the χ^2 test <http://www.graphpad.com/quickcalcs>. Distributions were considered to be different if the associated p-values were less than 0.05. Pearson's correlation coefficients between cell length and cell width distributions were calculated using Excel software.

Additional material

Additional file 1: Additional figures. Figures S1, S2, S3, S4 and S5.

Acknowledgements

We thank Thierry Enjalbert for preliminary constructs, and O. Espeli for the gift of plasmids and strains. We thank Roland Barriot and Hervé Seitz for help with the statistics, Philippe Guynet for help with mathematics; and Christian Lesterlin and Suckjoon Jun for helpful discussions. This work was funded by internal funding from the CNRS and University of Toulouse and by a grant from the *Agence Nationale de la Recherche* (ANR contract BLAN06-2 134012).

Author details

¹Université de Toulouse; Université Paul Sabatier; Laboratoire de Microbiologie et Génétique Moléculaires; F-31000 Toulouse; France. ²Centre National de la Recherche Scientifique; LMGM; F-31000 Toulouse; France. ³Current Address: Institute for Cell and Molecular Biosciences, The Medical School, University of Newcastle, 2nd Floor, Catherine Cookson Building, Framlington Place, Newcastle, NE2 4HH, UK.

Authors' contributions

JCM performed most experiments (strain construction and microscopy), analysed the data and wrote an early version of the paper. RM performed early experiments (strain construction and microscopy) and analysed the data. MS performed the experiments in Additional file, Figure S5 (strain construction and microscopy). CP constructed some of the strains. JYB constructed some of the strains, designed, analysed and interpreted the experiments, and wrote the paper. FC designed, analysed and interpreted the experiments, and wrote the paper. All authors read and approved the final manuscript.

Received: 15 November 2010 Accepted: 2 February 2011

Published: 2 February 2011

References

- Kellenberger E: Functional consequences of improved structural information on bacterial nucleoids. *Res Microbiol* 1991, **142**(2-3):229-238.
- Toro E, Shapiro L: Bacterial chromosome organization and segregation. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2010, **2**(2):a000349.
- Reyes-Lamothe R, Wang X, Sherratt D: *Escherichia coli* and its chromosome. *Trends Microbiol* 2008, **16**(5):238-245.
- Reyes-Lamothe R, Possoz C, Danilova O, Sherratt D: Independent positioning and action of *Escherichia coli* replisomes in live cells. *Cell* 2008, **133**(1):90-102.
- Gordon G, Sitnikov D, Webb C, Teleman A, Straight A, Losick R, Murray A, Wright A: Chromosome and low copy plasmid segregation in *E. coli*: visual evidence for distinct mechanisms. *Cell* 1997, **90**(6):1113-1121.
- Niki H, Yamaichi Y, Hiraga S: Dynamic organization of chromosomal DNA in *Escherichia coli*. *Genes Dev* 2000, **14**(2):212-223.
- Wang X, Liu X, Possoz C, Sherratt D: The two *Escherichia coli* chromosome arms locate to separate cell halves. *Genes Dev* 2006, **20**(13):1727-1731.
- Bates D, Kleckner N: Chromosome and replisome dynamics in *E. coli*: loss of sister cohesion triggers global chromosome movement and mediates chromosome segregation. *Cell* 2005, **121**(6):899-911.
- Espeli O, Mercier R, Boccard F: DNA dynamics vary according to macrodomain topography in the *E. coli* chromosome. *Mol Microbiol* 2008, **68**(6):1418-1427.
- Wang X, Possoz C, Sherratt D: Dancing around the divisome: asymmetric chromosome segregation in *Escherichia coli*. *Genes Dev* 2005, **19**(19):2367-2377.
- Nielsen H, Ottesen J, Youngren B, Austin S, Hansen F: The *Escherichia coli* chromosome is organized with the left and right chromosome arms in separate cell halves. *Mol Microbiol* 2006, **62**(2):331-338.
- Liu X, Wang X, Reyes-Lamothe R, Sherratt D: Replication-directed sister chromosome alignment in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 2010, **75**(5):1090-1097.
- Wiggins P, Cheveralls K, Martin J, Lintner R, Kondev J: Strong intranucleoid interactions organize the *Escherichia coli* chromosome into a nucleoid filament. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010, **107**(11):4991-4995.
- Lesterlin C, Barre F, Cornet F: Genetic recombination and the cell cycle: what we have learned from chromosome dimers. *Mol Microbiol* 2004, **54**(5):1151-1160.
- Crozat E, Meglio A, Allemand J, Chivers C, Howarth M, Vénien-Bryan C, Grainge I, Sherratt D: Separating speed and ability to displace roadblocks during DNA translocation by FtsK. *EMBO J* 2010, **29**(8):1423-1433.
- Mercier R, Petit M, Schbath S, Robin S, El Karoui M, Boccard F, Espéli O: The MatP/matS site-specific system organizes the terminus region of the *E. coli* chromosome into a macrodomain. *Cell* 2008, **135**(3):475-485.
- Bigot S, Sivanathan V, Possoz C, Barre F, Cornet F: FtsK, a literate chromosome segregation machine. *Mol Microbiol* 2007, **64**(6):1434-1441.
- Valens M, Penaud S, Rossignol M, Cornet F, Boccard F: Macrodomain organization of the *Escherichia coli* chromosome. *EMBO J* 2004, **23**(21):4330-4341.
- Li Y, Sergueev K, Austin S: The segregation of the *Escherichia coli* origin and terminus of replication. *Mol Microbiol* 2002, **46**(4):985-996.
- Nielsen H, Li Y, Youngren B, Hansen F, Austin S: Progressive segregation of the *Escherichia coli* chromosome. *Mol Microbiol* 2006, **61**(2):383-393.
- Li Y, Youngren B, Sergueev K, Austin S: Segregation of the *Escherichia coli* chromosome terminus. *Mol Microbiol* 2003, **50**(3):825-834.
- Luria S, Human M: Chromatin staining of bacteria during bacteriophage infection. *J Bacteriol* 1950, **59**(4):551-560.
- Bouet J, Woszczyk J, Repoila F, François V, Louarn J, Krisch H: Direct PCR sequencing of the *ndd* gene of bacteriophage T4: identification of a product involved in bacterial nucleoid disruption. *Gene* 1994, **141**(1):9-16.
- Bouet J, Campo N, Krisch H, Louarn J: The effects on *Escherichia coli* of expression of the cloned bacteriophage T4 nucleoid disruption (*ndd*) gene. *Mol Microbiol* 1996, **20**(3):519-528.
- Bouet J, Krisch H, Louarn J: *Ndd*, the bacteriophage T4 protein that disrupts the *Escherichia coli* nucleoid, has a DNA binding activity. *J Bacteriol* 1998, **180**(19):5227-5230.
- Berlatzky I, Rouvinski A, Ben-Yehuda S: Spatial organization of a replicating bacterial chromosome. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008, **105**(37):14136-14140.
- Woldringh C: The role of co-transcriptional translation and protein translocation (transertion) in bacterial chromosome segregation. *Mol Microbiol* 2002, **45**(1):17-29.
- Woldringh C, Nanninga N: Structural and physical aspects of bacterial chromosome segregation. *J Struct Biol* 2006, **156**(2):273-283.
- Funnell B: The P1 plasmid partition complex at *parS*. The influence of *Escherichia coli* integration host factor and of substrate topology. *J Biol Chem* 1991, **266**(22):14328-14337.
- Bouet J, Bouvier M, Lane D: Concerted action of plasmid maintenance functions: partition complexes create a requirement for dimer resolution. *Mol Microbiol* 2006, **62**(5):1447-1459.
- Datsenko K, Wanner B: One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000, **97**(12):6640-6645.

doi:10.1186/1471-2180-11-28

Cite this article as: Meile et al.: The terminal region of the *E. coli* chromosome localises at the periphery of the nucleoid. *BMC Microbiology* 2011 **11**:28.

Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit



AUTEUR : Mathieu STOUF

TITRE : Etude de la ségrégation de la région Terminale du chromosome d'*Escherichia coli*

DIRECTEUR DE THESE : François CORNET

RESUME

La ségrégation des chromosomes bactériens est une étape importante pour la conservation du matériel génétique d'une génération à l'autre. Cependant, les forces qui permettent de séparer les deux copies du chromosome répliquées sont encore inconnues à ce jour chez *Escherichia coli*. Au cours de la réplication, des dimères de chromosomes peuvent être formés par accident. Ces dimères, sont résolus en fin de cycle cellulaire dans la région Terminale du chromosome circulaire d'*E. coli* au niveau d'un site particulier : le site *dif*. La résolution de ces structures est contrôlée par la translocase à ADN FtsK. Cette pompe à ADN reconnaît des motifs biaisés sur l'ADN, nommé KOPS, qui orientent l'activité de FtsK de la région Origine vers la région Terminale. La région Terminale est organisée en une région condensée dans l'espace cellulaire par la présence de MatP, qui condense exclusivement cette région. La région Terminale dispose d'une dynamique qui lui est propre au cours du cycle cellulaire, cependant, si on sait que la ségrégation de la région Terminale se termine dans cette région, on ignore où et comment elle se termine.

Durant ma Thèse, nous nous sommes intéressés au profil de ségrégation de la région Terminale du chromosome d'*Escherichia coli*, ainsi qu'à la chorégraphie de cette région au cours des dernières étapes du cycle cellulaire. Dans un premier temps, nous avons construit un système de marquage de *loci* chromosomiques, dont l'expression est contrôlée, de manière à ce que, dans des conditions lentes de croissance, nous puissions observer et analyser la ségrégation de *loci* chromosomiques en détails. Nos résultats montrent que la ségrégation de la région Terminale est ordonnée et orientée, des *loci* éloignés du site *dif*, en direction de ce site, et que le dernier point de contact entre les deux copies du chromosome est le site *dif*. Nous montrons aussi que cet ordre de ségrégation est présent chez tous les chromosomes (monomères et dimères), et ce profil dépend de l'orientation de l'activité de FtsK en direction du site *dif*, ainsi que de l'organisation de la région Terminale en une région condensée par MatP. Dans un deuxième temps, nous nous sommes intéressés à la dynamique de la région Terminale en fin de cycle cellulaire. Nos résultats suggèrent que la chorégraphie de la région Terminale contrôle la fin du cycle cellulaire. Quand cette région est décondensée, la localisation des *loci* en dehors de cette région, dans les régions Origines, Left et Right est modifiée. Une mobilité accrue des *loci* des régions Left et NS-R est observée et nous montrons que la chorégraphie, après ségrégation de ces régions, par la présence de SlmA sur ces séquences, serait responsable du retard de division observé en *matP*⁻. Ces résultats permettent de comprendre plus clairement la dynamique de la région Terminale lors des dernières étapes du cycle cellulaire.

MOTS CLEFS : ségrégation des chromosomes, FtsK, MatP, dynamique du nucléoïde, fin du cycle cellulaire

Laboratoire de Microbiologie et Génétique Moléculaires, UMR5100, CNRS-UPS.
118 Route de Narbonne. 31062 Toulouse Cedex 9