



HAL
open science

La cohésion des chromatides sœurs chez *Escherichia coli*

Emmanuelle Gigant

► **To cite this version:**

Emmanuelle Gigant. La cohésion des chromatides sœurs chez *Escherichia coli*. Sciences agricoles. Université Paris Sud - Paris XI, 2012. Français. NNT : 2012PA112347 . tel-00776480

HAL Id: tel-00776480

<https://theses.hal.science/tel-00776480>

Submitted on 15 Jan 2013

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

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

Université Paris-Sud 11

Centre de Génétique Moléculaire – CNRS UPR3404



ECOLE DOCTORALE GÈNES, GÉNOMES, CELLULES

Thèse présentée par:

Emmanuelle Gigant

Pour obtenir le grade de:

Docteur en Biologie de l'Université Paris-Sud 11

La cohésion des chromatides sœurs
chez *Escherichia coli*

thèse soutenue le 30 novembre 2012 devant le jury composé de:

Dr. Jean-Yves BOUET	Chargé de recherche	Rapporteur
Dr. Marcelo NOLLMANN	Chargé de recherche	Rapporteur
Dr. François-Xavier BARRE	Directeur de recherche	Examineur
Dr. Marc NADAL	Professeur	Examineur
Dr. Angela TADDEI	Directrice de recherche	Examinatrice
Dr. Olivier ESPELI	Chargé de recherche	Directeur de thèse

Table des matières

Remerciements :	4
Liste des abréviations :	6
Liste des figures :	7
Introduction	10
I. Le chromosome d'<i>Escherichia coli</i>	10
1. <i>Escherichia coli</i> un organisme modèle	10
2. Le chromosome d' <i>Escherichia coli</i>	11
II. Le cycle cellulaire	12
1. Le cycle cellulaire eucaryote	12
2. Le cycle cellulaire bactérien	13
3. La réplication du chromosome bactérien	14
4. La ségrégation des chromosomes bactériens	15
5. Dynamique de ségrégation des plasmides bactériens	17
6. La cohésion des chromosomes chez les bactéries	19
III. La cohésion des chromatides sœurs chez les eucaryotes	20
1. La cohésion des chromatides sœurs	21
2. Acteurs de la cohésion des chromatides sœurs	23
a. Les condensines	23
a. Les cohésines	25
IV. Ségrégation / cohésion dans le contexte d'une molécule structurée	26
1. Structure topologique	26
a. Surenroulement libre	27
b. Le surenroulement est modifié localement par la réplication et transcription	28
c. Les plectonèmes où microdomaines de surenroulement	28
d. Les topoisomérases	29
e. Surenroulement contraint	32
2. Comment les éléments de structuration influencent-ils la ségrégation du chromosome ?	33
a. Conséquences des altérations de SMC/MukBEF chez les bactéries	33

b. Interactions entre topoisomérases et condensines.....	33
c. Rôles des macrodomaines dans la ségrégation des chromosomes	35
3. La ségrégation du chromosome est intégrée dans le cycle cellulaire	36
a. SeqA.....	36
b. SImA.....	36
c. FtsK	37
d. MatP-ZapB.....	38
V. Le projet de thèse	39
Les résultats	42
I. Présentation de l'article : « Sister chromatid interactions in bacteria revealed by a site-specific recombination assay ».....	42
1. Résumé de l'article	42
II. Résultats complémentaires de l'article : « Sister chromatid interactions in bacteria revealed by a site-specific recombination assay »	43
III. Calibration du test de recombinaison intermoléculaire.....	44
1. Influence du cycle cellulaire sur la cohésion moléculaire	44
2. Validation du test intermoléculaire : la recombinaison entre chromatides sœurs génère des dimères de chromosomes.....	45
IV. Impacts des divers acteurs influençant la colocalisation sur la cohésion des chromatides sœurs.....	46
1. Le site centromérique <i>migS</i> n'influence pas l'interaction entre chromatides sœurs.....	46
2. La méthylation de l'ADN affecte la recombinaison <i>loxP/ Cre</i> indépendamment des chromatides sœurs.	46
3. L'altération du C-terminus de FtsK altère la cohésion entre chromatides sœurs au niveau du locus <i>Ter-dif</i>	48
V. Contraintes topologiques et chromatides sœurs.....	48
1. La novobiocine, inhibiteur de l'ADN gyrase, bloque la recombinaison <i>laclox</i>	48
2. La surexpression de la TopoIV réduit les échanges entre chromatides sœurs.....	50
3. Visualisation des précatéanes juste après le passage des fourches de réplication	52
VI. Mesure de la fréquence de recombinaison intermoléculaire dans un contexte où l'ADN subit des lésions.	54
La discussion.....	56

I. La cohésion des chromatides sœurs chez les bactéries.....	56
Colocalisation versus cohésion des chromatides sœurs.....	56
II. La topologie des chromatides sœurs.....	58
1. La caténation des chromatides sœurs eucaryotes	58
2. Comment les précaténanes peuvent ils maintenir la cohésion d'un chromosome en cours de réplication ?	59
III. Les acteurs de la cohésion moléculaire chez les bactéries.....	61
1. Le contrôle de la TopoIV.....	61
2. Existe-t-il une cohésine non identifiée ?.....	62
3. IV Le rôle de la cohésion des chromatides sœurs.....	62
Annexes	66
I. Présentation de l'article : « A MatP-divisome interaction coordinates chromosome segregation with cell division in <i>E. coli</i> ».....	66
1. Résumé de l'article	66
II. Résultats complémentaires de l'article : "A MatP-divisome interaction coordinates chromosome segregation with cell division in <i>E. coli</i>"	67
Matériel et méthodes	69
Bibliographie.....	74

Liste des abréviations :

ADN : Acide DésoxyriboNucléique

ARN : Acide Ribonucléique

ATP : Adénosine TriPhosphate

DAPI : 4', 6-DiAmino-2-PhénylIndole

FACS : Fluorescence Associated Cell
Sorter

Fis : factor for inversion sequence

FISH : Fluorescent In Situ Hybridation

FROS : Fluorescent Repressor Operateur
System

GFP : Green Fluorescent Protein

H-NS : Heat-stable-nucleotid-structuring

HU : « Histone Like » protein form E. coli
strain

IHF : Integration Host Factor

IPTG : Isopropyl β -D-1-
thiogalactopyranoside

Kb : kilobase

kD : kilodalton

KOPS : FtsK Orienting Polar Sequences

LB : Luria Broth

Lk : Linking number

Mb : Mégabase

MD : Macrodomaine

NAPs : Nucleoïd Associated Proteins

ORF : Open Reading Frame

oriC : Origin of Replication Initiation of *E.*
coli

parS : partition Site

pb : paire de base

PBS : phosphate buffured saline

PCR : polymerase chain reaction

RFT : Replication Fork Trap

SMC : structure maintenance of
chromosome

SOS : Save Our Soul

TBE : Tris/Borate/EDTA

TopoIV : Topoisomérase IV

ts : thermo-sensible

Tw : twist

Wr : Writhe

Xgal : 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-
galactopyranoside

Liste des figures :

Figure 1 : Les nucléoides d'*Escherichia coli*

Figure 2 : Le chromosome d'*Escherichia coli* en cours de réplication

Figure 3 : Représentation schématique du cycle cellulaire eucaryote et bactérien

Figure 4 : La région de la terminaison de réplication chez *Escherichia coli*

Figure 5 : Séparation du chromosome d'*Escherichia coli*

Figure 6 : Ségrégation asymétrique du chromosome bactérien

Figure 7 : Suivi au cours du temps de la localisation du plasmide mini-P1

Figure 8 : La cohésion des chromatides soeurs durant le cycle cellulaire eucaryote

Figure 9 : Modèles de chargement des cohésines sur l'ADN au cours de la réplication

Figure 10 : Architecture des protéines SMC et des complexes protéiques SMC

Figure 11 : Le complexe SMC bactérien et son modèle de fixation sur l'ADN

Figure 12 : Les différents états d'une molécule d'ADN circulaire

Figure 13 : Modèle de contrainte topologique induite par la transcription et la réplication

Tableau 1 : Les complexes de protéines SMC

Figure 14 : Représentation des plectonèmes

Figure 15 : Les différentes activités des topoisomérases de type II

Figure 16 : Modélisation des acteurs de la fin du cycle cellulaire

Figure 17 : Organisation du nucléoïde en macrodomaines

Figure R1 : L'influence du cycle cellulaire sur la recombinaison intermoléculaire

Figure R2 : Le système *laclox* intermoléculaire révèle l'interaction entre chromatides soeurs

Figure R3 : Le site centromérique *migS* n'influence pas la cohésion des chromatides soeurs

Figure R4 : L'impact de la méthylation de l'ADN sur l'interaction entre chromatides soeurs

Figure R5 : L'altération de la protéine FtsK n'affecte pas la cohésion des chromatides soeurs

Figure R6 : L'effet de la novobiocine, inhibiteur de la gyrase, sur la recombinaison *laclox*

Figure R7 : Test de surexpression de la TopoIV portée par le plasmide pLexTopoIV

Figure R8 : L'effet de la surexpression de la TopoIV sur l'interaction entre chromatides sœurs

Figure R9 : Détection des précaténanes à l'arrière des fourches de réplication

Figure R10 : Détection des précaténanes dans une population cellulaire non synchronisée

Figure R11 : La création de dommage dans l'ADN n'affecte pas l'interaction entre chromatides sœurs

Figure R12 : La protéine RecN influence l'interaction entre chromatides sœurs en présence de dommages sur l'ADN

Figure D1 : La colocalisation et la cohésion moléculaire, deux étapes distinctes dans le cycle cellulaire

Figure D2 : Modèle de cohésion des chromatides sœurs avant leur séparation active

Introduction

Introduction

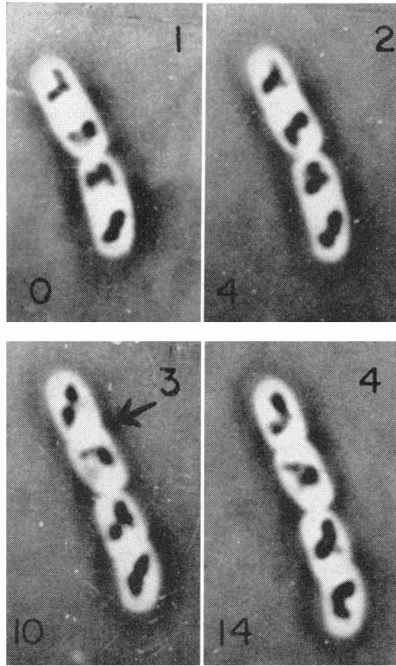
I. Le chromosome d'*Escherichia coli*

1. *Escherichia coli* un organisme modèle

Depuis sa découverte en 1885 par Theodor Escherich, la bactérie *Escherichia coli* est devenue le modèle bactérien le plus étudié et utilisé dans la recherche fondamentale mais aussi appliqué. *Escherichia coli* est une enterobactérie, elle appartient à la division des γ proteo bactéries. Le génome d'*Escherichia coli* a été séquencé en 1997 (Blattner et al., 1997). Son génome, un chromosome circulaire, comprend 4,6 millions de paires de bases codant pour environ 4 200 protéines.

Certaines *Escherichia coli* sont connues comme vecteurs de maladies et ont fait récemment la une de l'actualité. En effet, en mai 2011 débute une épidémie de gastro-entérite et de syndrome hémolytique et urémique en Europe. Connue sous le terme de « crise du concombre », cette épidémie, due à la bactérie *Escherichia coli* O104 :H4 de la famille des *Escherichia coli* entérohémorragiques, a eu de lourdes répercussions sur l'industrie alimentaire et la filière agricole espagnole. Pourtant, cette bactérie est surtout naturellement présente et essentielle dans l'intestin humain. Au cœur de la génétique bactérienne et de la biologie moléculaire, elle est devenue un modèle de choix pour comprendre et approfondir les connaissances de nombreux processus biologiques essentiels. Ces découvertes ont valu aux chercheurs utilisant *E. coli* comme modèle, plusieurs prix Nobel notamment, en 1965, à Jacques Monod, François Jacob et André Lwoff pour avoir mis en évidence le rôle de l'ARN messenger comme transmetteur de l'information génétique chez la bactérie *E. coli*. Plus tôt en 1959, elle a permis à Severo Ochoa et Arthur Kornberg d'obtenir le prix Nobel pour leurs découvertes sur la synthèse des acides ribonucléiques et désoxyribonucléiques. Dès 1955, Kornberg se penche sur la synthèse de l'acide désoxyribonucléique (ADN), molécule de l'hérédité contenue dans les chromosomes. À partir de la bactérie *Escherichia coli*, il parvient à isoler et purifier l'enzyme qui catalyse la formation de l'ADN à partir des désoxyribonucléotides : cette enzyme est baptisée ADN polymérase I. La période 1958 - 1969 fut particulièrement faste pour la biologie moléculaire puisque six prix Nobel de physiologie ou de médecine et trois prix de chimie furent attribués dans ce domaine, dont quatre prix qui font appel à l'étude de la bactérie *E. coli*. Plus récemment, la mise en évidence des capacités

A



B

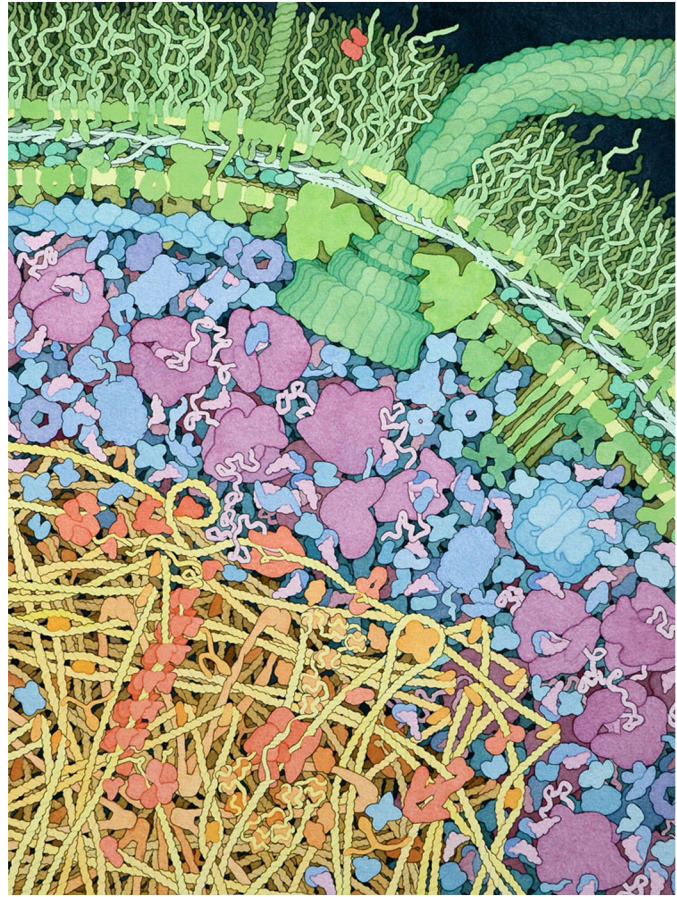


Figure 1 : Les nucléoides d'*Escherichia coli*

A. Observation du nucléoïde bactérien *in vivo* par augmentation du contraste de phase en présence de gélatine dans les cellules d'*E. coli*. (Mason and Powelson, 1955)
Les nucléoides forment une masse noire compacte dans la cellule.

B. Représentation des macromolécules présentes dans le cytoplasme et les nucléoides. (Goodsell, 2009)

catalytiques de l'ARN formant la RNaseP d'*E. coli* a permis à Sidney Altman d'obtenir le prix Nobel 1989 de chimie.

E. coli est un bacille de forme cylindrique qui mesure environ 3 micromètres de long et 0,8 de large. Le principal atout responsable de son succès est la possibilité d'avoir un temps de génération court de 25min. Aujourd'hui, *E. coli* est l'organisme modèle le mieux caractérisé. *E. coli* est devenue également un vecteur de développement technologique.

2. Le chromosome d'*Escherichia coli*

Le chromosome d'*Escherichia coli* est condensé dans la cellule en une structure appelée nucléoïde. Le nucléoïde peut être observé dans la cellule bactérienne par contraste de phase au microscope (Figure 1A). Le nucléoïde résulte de la compaction d'environ 1000 fois du chromosome dans la cellule. Le nucleoïde occupe environ 15% du volume cellulaire (Holmes and Cozzarelli, 2000). Libre de membrane nucléaire, le nucleoïde se retrouve confronter à l'espace encombré du cytoplasme comme David Goodsell le représente Figure 1B. L'encombrement moléculaire du cytoplasme participe à la compaction du nucleoïde. Cette compaction est extrêmement dense mais également très flexible pour permettre une accessibilité à l'ADN pour tous processus et mécanismes qui y sont liés comme la réplication, la transcription des gènes et leurs contrôles, la réparation, la ségrégation ...

En phase de croissance, le chromosome d'*E. coli* est dupliqué une fois par cycle cellulaire ce qui permet la transmission de l'information génétique aux deux cellules filles. La réplication du chromosome d'*E. coli* est initiée en un site unique appelé *OriC*. Les deux fourches de réplication se forment et progressent de façon bidirectionnelle sur le chromosome circulaire. La fin de la réplication correspond à la rencontre des deux fourches de réplication dans la région située à l'opposé d'*OriC*, la région terminus centrée autour du site *dif*. Ainsi, le chromosome d'*E. coli* est divisé en deux bras de réplication de la même taille : le bras droit et le bras gauche (Figure 2). Les bras de réplication, aussi appelés réplichores, sont définis par l'axe *OriC/dif*. Cette organisation en réplichores a été retrouvée dans tous les génomes bactériens.

La réplication du chromosome se fait de manière asymétrique : l'un des brins d'ADN appelé le brin précoce, est répliqué de manière continue, et l'autre brin, le brin tardif, est répliqué de manière discontinue. Des biais de composition nucléaire ont été observés sur les brins précoce et tardif. Un brin d'ADN présente donc des différences selon s'il est répliqué de

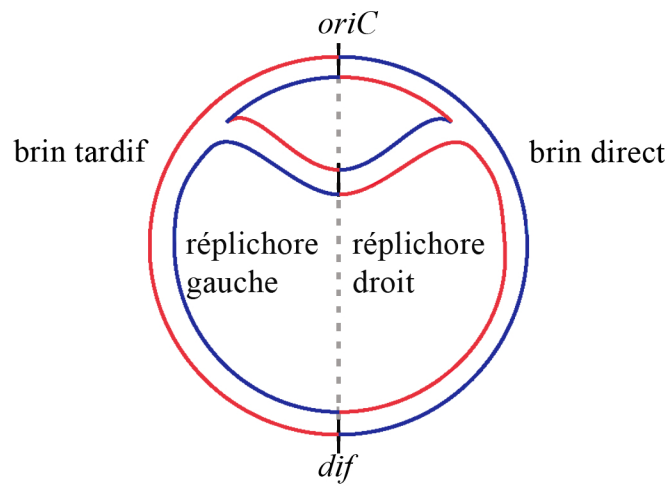


Figure 2 : Le chromosome d'*Escherichia coli* en cours de réplication

Organisation en réplichores : la réplication bidirectionnelle définit un axe de symétrie du chromosomes. *oriC* : origine de réplication ; *dif* : terminus de réplication. le brin direct est en bleu et le brin tardif en rouge.

façon continue ou discontinue. En outre, ces différents biais changent de brin de manière brutale au niveau d'*OriC* et de *dif*. On observe des biais de composition en bases GC, dans la distribution d'oligomères et des gènes mais aussi dans l'orientation des gènes. L'ensemble de ces données vont définir les réplichores du chromosome (pour revue (Rocha, 2004), (Rocha, 2008)). Par exemple, le brin direct est enrichi en gènes. Ce biais de composition représente 55% des gènes d'*Escherichia coli* et 74% des gènes de *Bacillus subtilis* (Rocha and Danchin, 2003). L'orientation des gènes fortement exprimés (par exemple les opérons ribosomiaux) et des gènes essentiels est fortement biaisée par une co-orientation transcription / réplication. Toutes les hypothèses suggèrent que ce biais d'orientation des gènes révèle la coordination entre les mécanismes de réplication et de transcription. Comme les événements de réplication et de transcription ne sont pas dissociés durant le cycle cellulaire, des conflits peuvent survenir entre ces deux mécanismes majeurs de l'ADN. En effet, l'ADN polymérase se déplace 10 à 20 fois plus vite que l'ARN polymérase de sorte que la collision entre les deux complexes est inévitable quelque soit leur sens de progression (French, 1992). Toutefois les conséquences des collisions frontales seraient plus graves que les collisions dans la même orientation pour générer une pression de sélection expliquant la formation des biais.

II. Le cycle cellulaire

Au cours du cycle cellulaire, l'ensemble du patrimoine génétique d'une cellule est transmis à chacune des deux cellules filles. Le cycle cellulaire est une série d'évènements qui se succèdent entre deux divisions cellulaires. Les deux grandes étapes essentielles pour assurer la pérennité de la descendance sont la réplication (ou duplication) du génome et la séparation (ou ségrégation) égale des deux copies du génome dans chaque future cellule fille.

1. Le cycle cellulaire eucaryote

Le cycle cellulaire des cellules eucaryotes se divise en quatre phases successives et distinctes. La réplication du génome se fait au cours de la phase S (pour Synthèse) puis les copies du génome (appelées chromatides sœurs) vont être partagées équitablement au cours de la phase de division appelée mitose (M). Pendant l'interphase, la période qui sépare deux événements de mitose, trois étapes vont se suivre : une phase de croissance et de préparation à la réplication de l'ADN (G1), une phase de réplication de l'ADN (S) et une phase de

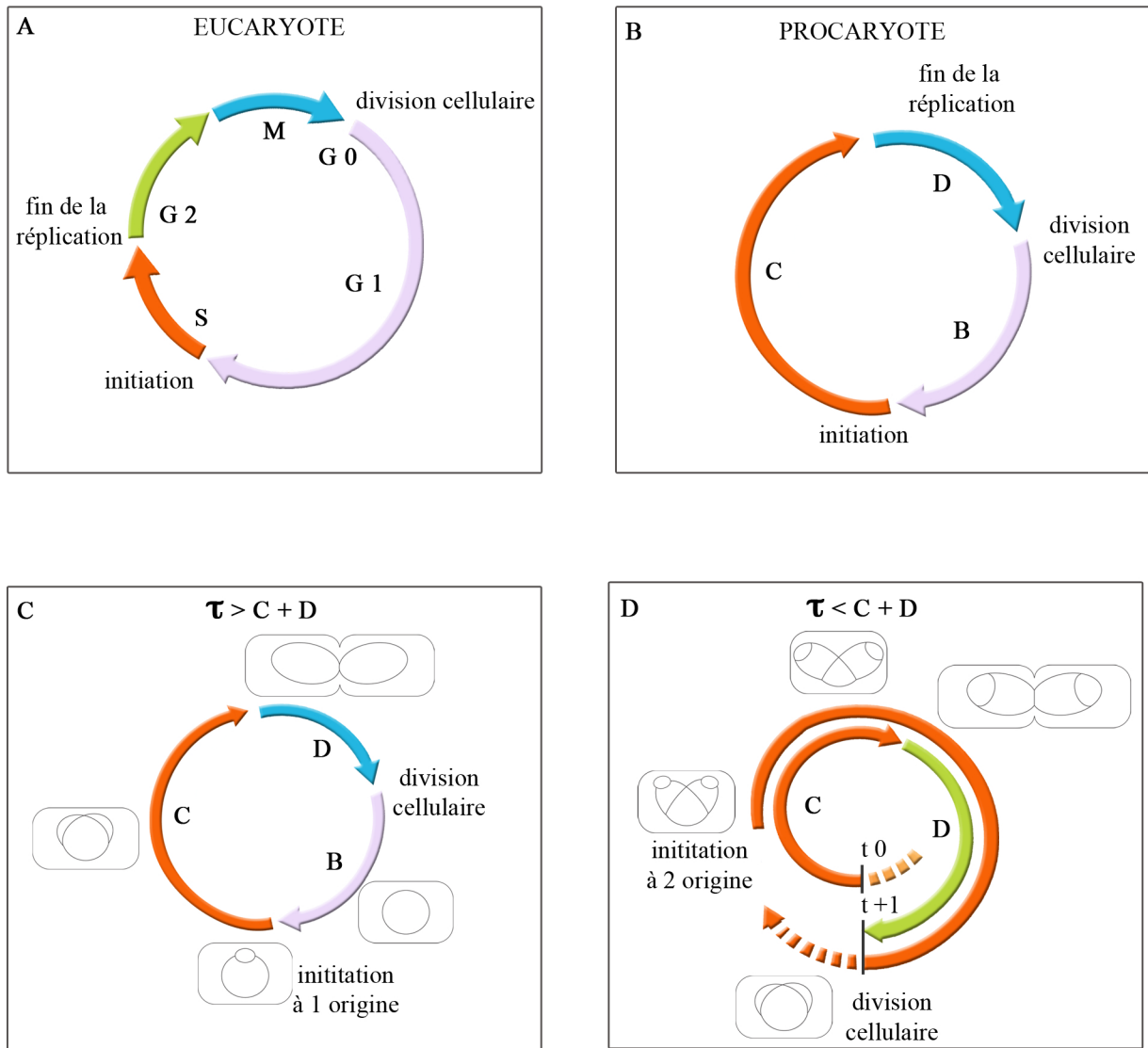


Figure 3 : Représentation schématique du cycle cellulaire eucaryote et bactérien

Les différentes phases du cycle cellulaire sont représentées en A pour les cellules eucaryotes et en B pour les cellules bactériennes. La phase de réplication (S et C) est indiquée en orange. Elle est suivie de la phase G 2 ou B qui sont situées entre la division et l'initiation. C'est uniquement chez les eucaryotes qu'existe une phase de séparation des chromosomes bien dissociée des autres étapes du cycle cellulaire : la phase M (bleu).
 Suivant le temps de génération des cellules bactériennes, l'enchaînement des étapes du cycle cellulaire va être modifié : en C, un seul cycle de réplication est initié sur un unique chromosome. Tandis qu'en D, l'initiation de la réplication précédente n'est pas achevée à la naissance de la cellule à t 0. La réplication est initiée sur deux origines d'un chromosome en cours de duplication, elle se poursuivra dans les cellules filles après la division à t + 1.

croissance et de préparation à la mitose (G2) (Figure 3A). Des mécanismes de contrôle permettent de réguler le changement de phase : la phase suivante ne peut commencer sans que la précédente soit validée par des *check point*. La phase de réplication (S) est séparée temporellement de la phase de séparation (M) par une longue période la phase G2 au cours de laquelle les chromosomes subissent de grands changements morphologiques (principalement observés chez les métazoaires). C'est uniquement pendant la phase M que débute les mécanismes de ségrégation des chromosomes avec la mise en place des microtubules et du fuseau mitotique. Les chromatides sœurs sont donc maintenues au contact l'une de l'autre, depuis leur réplication jusqu'à la ségrégation par un mécanisme appelé la cohésion des chromatides sœurs qui couvre la fin de la phase S, la Phase G2 et le début de la phase M jusqu'à l'anaphase.

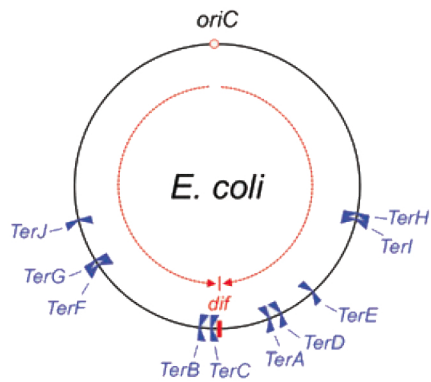
2. Le cycle cellulaire bactérien

Le cycle cellulaire bactérien présente des étapes concomitantes. Selon les conditions de croissance, le chromosome va subir simultanément la réplication, la ségrégation alors que la cytokinèse est également initiée. La réplication se déroule durant la période C (équivalent à la phase S eucaryote). La période D est l'intervalle de temps entre la fin de la réplication et la division cellulaire ; elle est équivalente à la phase G2. Enfin la période B se situe entre la division cellulaire et le début de la réplication (équivalent de G1). La période de ségrégation des chromosomes n'est pas clairement dissociée puisqu'elle commence alors que la réplication n'est pas achevée (Figure 3B), la cytokinèse peut également être initiée avant la fin de la réplication.

Le temps de génération τ qui correspond au temps séparant deux divisions cellulaires est facilement estimable, τ est le temps nécessaire au doublement de population. τ peut également être exprimé comme le temps d'inter-initiation (I) qui va du début de la période C à la prochaine période C, puisque l'on n'observe qu'une initiation par chromosome pour chaque cycle cellulaire (Helmstetter, 1996).

Le profil et les paramètres du cycle cellulaire varient fortement chez *E. coli* en fonction de la vitesse de croissance (Figure 3C et D). C'est une particularité d'*E. coli* et des enterobactéries qui n'est pas observée chez de nombreuses autres bactéries. Par exemple *Pseudomonas Aeruginosa* ou *Caulobacter crescentus* ne modifie que légèrement leur cycle cellulaire en fonction du milieu de croissance. Chez *E. coli*, suivant le temps de génération,

A



B

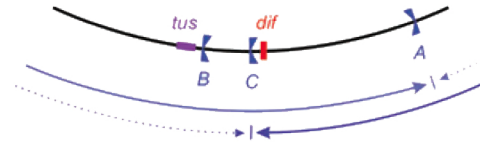


Figure 4 : La région de la terminaison de réplication chez *Escherichia coli*

A. Orientation et localisation des sites *ter* sur le chromosome d'*E. coli* : Le piégeage des fourches est formé par 2 groupes de sites opposés, les sites *ter* C, B, F, G et J bloquent les fourches du bas droit de la réplication ; et le groupe *ter* A, D, E, I et H bloquent les fourches du bas gauche (Duggins et al., 2008).

B. Schéma représentant la «Replication Fork Trap» et la progression possible de chacune des fourches dans ces régions

les différentes phases vont se succéder (type eucaryote) ou se chevaucher. Dans des conditions où $\tau > C+D$, après la division, la réplication est initiée dans les cellules filles sur l'origine de l'exemplaire unique du chromosome présent dans la cellule. Dans d'autres conditions où $\tau < C+D$, la réplication est initiée sur plusieurs origines de manière synchrone au cours du ou des cycle cellulaires n_{-1} ou n_{-2} (cellule mère ou grand mère) pour se terminer dans le cycle cellulaire n (cellule fille). La division cellulaire s'effectue alors que la réplication est en cours. Les paramètres décrivant le cycle cellulaire sont mesurables par des techniques de cytométrie de flux (Skarstad et al., 1986) ou de mesure de la fréquence marqueurs (Sueoka and Yoshikawa, 1965). Depuis quelques années, l'observation directe des protéines de réplication et de division cellulaires par microscopie à fluorescence a permis de raffiner la description de ces paramètres (Lemon and Grossman, 1998) (Bates and Kleckner, 2005) (Berkmen and Grossman, 2006).

3. La réplication du chromosome bactérien

La réplication est principalement contrôlée par un mécanisme qui inhibe la formation d'un nouveau complexe d'initiation jusqu'à atteindre la masse cellulaire d'initiation (Donachie, 1968). Dans des conditions de croissance où la cellule possède deux origines de réplication, l'initiation de réplication se fait de manière parfaitement synchrone sur les deux origines. Après initiation de la réplication au site *OriC*, les deux fourches de réplication progressent de manière bidirectionnelle sur le chromosome pour atteindre le site de terminaison. La vitesse optimale de réplication est de 1000 nucléotides par secondes. Les travaux anciens, avec les souches d' *E. coli* B, suggéraient que cette vitesse variait peu lors de changement du milieu de croissance (Helmstetter, 1996). Les travaux récents réalisés avec *E. coli* K12 montrent que la vitesse de réplication est en fait modulable de manière coordonnée avec la vitesse de croissance (Bates and Kleckner, 2005) (Espeli et al., 2008). Le contrôle à l'initiation de la réplication en fonction de la masse cellulaire (Cooper and Helmstetter, 1968) est aussi questionné par les travaux avec des cellules synchronisées ; un contrôle par la division cellulaire est maintenant proposé (Bates and Kleckner, 2005) (Cooper, 2006).

La terminaison de la réplication s'effectue dans la région opposée à l'origine de réplication. Cette région est définie par la présence de sites *ter* (Figure 4A). Les sites *ter* sont des sites asymétriques de 23pb. Il existe dix sites *ter*, chez *E. coli* (Figure 4A) (pour revue

(Duggin et al., 2008)). L'interaction des sites *ter* avec la protéine Tus va permettre le passage de la fourche de réplication dans un sens unique et de bloquer leur progression dans le sens non permissif. Les sites flanquant le site *dif* définissent une région appelée RFT (pour « Replication Fork Trap ») (figure 4B). Dans la RFT, les fourches vont être piégées pour éviter la progression excessive d'une fourche de réplication sur le réplicore opposé. La convergence des fourches de réplication crée de fortes contraintes topologiques qui peuvent bloquer la progression de la réplication. Récemment il a été montré *in vitro* que la protéine RecQ associée à la TopoIII et à la protéine SSB pouvaient éliminer ces contraintes topologiques (Suski and Marians, 2008). Il semble que RecQ déroule l'ADN non répliqué entre les réplisomes arrêtés pendant que la TopoIII sépare les simples brins formés par l'action de RecQ. Toutefois, *in vivo*, les mutations dans les gènes codants pour les protéines RecQ et TopoIII, séparément ou pris ensemble, n'ont pas de conséquences physiologiques sur la cellule. Les mécanismes qui entourent la terminaison de la réplication restent encore mal connus. Pourtant, la TopoIII semble avoir une action complémentaire de la TopoIV sur la ségrégation des chromosomes. En effet, la surexpression de la TopoIII supprime la sensibilité à la novobiocine (inhibiteur des topoisomérases de type II) des souches déficientes en TopoIV et en TopoIII (Perez-Cheeks et al., 2012).

4. La ségrégation des chromosomes bactériens

La ségrégation des chromosomes est un processus précis qui assure le partage égal des chromosomes répliqués dans chaque cellule fille. Moins d'une cellule sur 30 000 cellules se retrouve dépourvu l'ADN en raison d'un défaut de ségrégation (Niki et al., 1991). Les progrès en microscopie ont permis de développer des approches cytologiques pour étudier le comportement des chromosomes au sein de la cellule au cours du cycle cellulaire. Le chromosome montre une chorégraphie ordonnée et précise au cours du cycle cellulaire. A ce jour, la ségrégation des chromosomes a été étudiée en détails chez cinq bactéries modèles : *E. coli*, *B. subtilis*, *C. crescentus*, *Vibrio cholerae* et *P. aeruginosa* (pour revue (Possoz et al., 2012) ; Isabelle Vallet-Gely, communication personnelle). Ces cinq modèles révèlent de nombreuses différences dans les chorégraphies de ségrégation mais montrent également des constantes : la ségrégation des chromosomes bactériens est concomitante avec leur réplication, la ségrégation suit globalement l'ordre *oriC-ter* et la ségrégation est progressive.

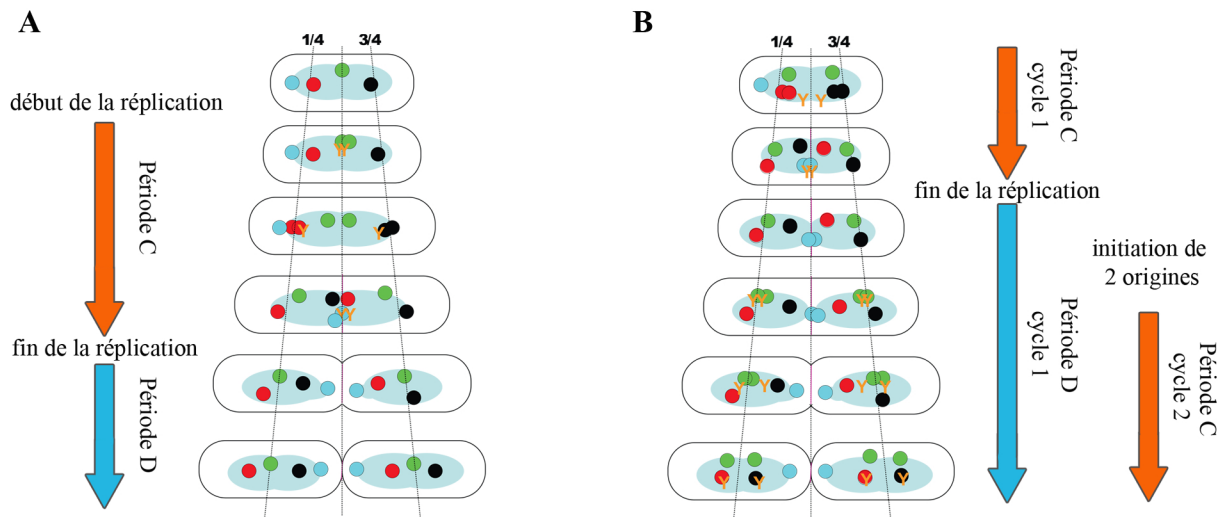


Figure 5 : Séparation du chromosome d' *Echerichia coli*

La représentation de la séparation des 4 loci ciblés du chromosome d' *E coli* en condition favorisant un cycle cellulaire semblable au cycle cellulaire eucaryote en A et en condition favorisant le chevauchement de la réplication et la division en B, décrit dans la figure 3. Les phases de réplication (C) et de division (D) sont représentées sur le schéma. Les réplisomes sont représentés par des γ . Les régions Ori, Right, Letf et Ter sont schématisées respectivement par des ronds vert, noir, rouge et bleu au sein de l'espace occupé par le nucléoïde.

Les premières études décrivaient la ségrégation globale du nucléoïde chez *E. coli*. Par des observations en contraste de phase, on peut constater les variations de forme du nucléoïde dans les cellules en cours de croissance (Mason and Powelson, 1956). Ainsi, suivant les étapes du cycle cellulaire, les nucléoïdes peuvent être allongés ou plus distinctement lobés (Yamaichi and Niki, 2004). Dans des cellules nouvellement nées, le nucléoïde initie la ségrégation avec une séparation brutale de la forme cylindrique à une forme bilobée (Bates and Kleckner, 2005). Cette séparation semble être contrôlée et régulée suivant la vitesse de croissance.

Des études de microscopie ont permis d'observer précisément chaque région du chromosome en utilisant une technique appelée FROS (Fluorescent Repressor Operator System) qui fait appel à un site opérateur, par exemple *lacO* sur lequel se lie le répresseur LacI couplé à la GFP. Le site opérateur est intégré dans le chromosome aux sites proches de *oriC* et du terminus. Avec cet outil, les régions du chromosome peuvent être suivies au cours du temps durant des expériences de time-lapse. Les loci proches d'*oriC* et de *dif*, ont été particulièrement étudiés, ils présentent des profils spécifiques de ségrégation. La ségrégation de ces deux régions a été suivie par de nombreuses études (Gordon et al., 1997) (Elmore et al., 2005) (Nielsen et al., 2007) (Adachi et al., 2008) (Li et al., 2002) (Li et al., 2003) (Wang et al., 2005) (Espeli et al., 2008).

Dans des conditions de croissance lente, la région origine est au centre de la cellule où elle est répliquée. Dans des conditions de croissance plus rapide où deux cycles de réplication se chevauchent (Figure 3D), la réplication des origines se fait aux positions $\frac{1}{4}$ et $\frac{3}{4}$ de la cellule. La ségrégation des origines après réplication se fait de manière symétrique vers les positions $\frac{1}{4}$ et $\frac{3}{4}$ qui seront les futurs centres des cellules filles (Figure 5B). Cette position où les origines attendent leur prochaine réplication est appelée la « home position » (Gordon et al., 1997)(Elmore et al., 2005)(Espeli et al., 2008). La ségrégation du chromosome d'*E. coli* ne débute pas par la séparation des origines. La première région ségrégée est le site *migS* situé sur le bras droit de réplication à 250 kb d'*OriC* (Yamaichi and Niki, 2004). *migS* accélère la séparation des origines de réplication mais n'est pas essentiel à la viabilité de la cellule. en l'absence de *migS*, les origines ont une localisation plus proche dans la cellule après leur séparation (Yamaichi and Niki, 2004).

Pendant la migration des origines vers les « homes positions », les régions intermédiaires, entre l'origine et le terminus de réplication, sont ségrégées. Les bras de réplication sont globalement ségrégés selon l'organisation génétique : les régions les plus

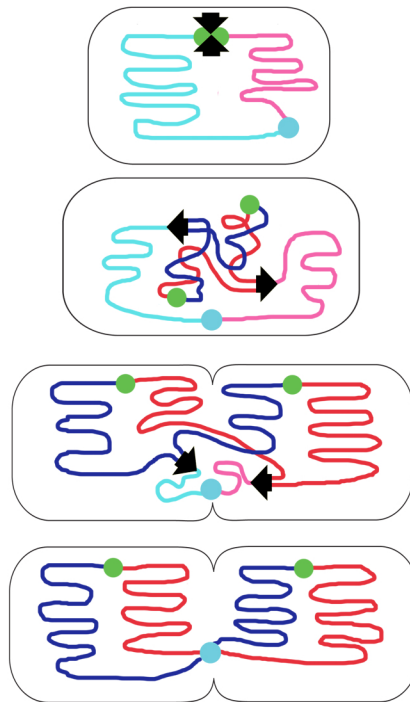


Figure 6 : Ségrégation asymétrique du chromosome bactérien

La réplication est initiée à l'origine de réplication (point vert) et les fourches de réplication (triangles noirs) sont au centre de la cellule. Les deux bras de réplication du chromosome, le bras gauche en bleu et le bras droit en rouge, sont positionnés de chaque côté de la cellule. Au cours de la réplication, les fourches de réplication restent au centre de la cellule et suivent le substrat d'ADN jusqu'à la région terminale (point bleu). Les produits de réplication restent proches puis se ségrègent vers des directions opposées. A la fin de la réplication, les nouvelles régions origines sont positionnées aux 1/4 et 3/4 de la cellule et les bras de réplication sont disposés selon une organisation Left-Right/Left-Right. Le terminus de réplication reste localisé au centre de la cellule.

proches d'*oriC* seront ségrégués en premier et seront les plus proches de l'origine, les *termini* sont les derniers ségrégués (Niki et al., 2000)(Li et al., 2002)(Bates and Kleckner, 2005). Différentes études montrent que le chromosome est ségrégué en conservant l'organisation répliquative du chromosome en réplicore droit et réplicore gauche (Wang et al., 2005) (Nielsen et al., 2006b). Chaque réplicore semble occuper une moitié de la cellule au début du cycle de réplication. Après initiation de la réplication au centre de la cellule où se trouve la région origine, les deux régions origines vont être ségrégués suivant l'organisation Left-*oriC*-Right-Ter-Left-*oriC*-Right (Figure 6). Ce modèle de ségrégation propose une séparation asymétrique des chromosomes (Wang et al., 2005) (Nielsen et al., 2006b) qui est corrélée avec l'asymétrie de réplication. Les brins précoces sont ségrégués vers les nouveaux pôles alors que les brins tardifs migrent vers les anciens pôles de la cellule (White et al., 2008).

La région du terminus est la dernière région à être ségréguée. Sa réplication se produit au centre de la cellule où l'on peut observer la duplication du signal fluorescent. Après réplication, les deux loci *ter* vont être ségrégués de façon symétrique dans les futures cellules filles pour se trouver à proximité des nouveaux pôles après division (Figure 5A) (Bates and Kleckner, 2005) (Li et al., 2003) (Espeli et al., 2008). Dans la souche d'*E. coli* AB1157, la ségrégation du Terminus de réplication peut être sensiblement différente. Après la séparation des deux loci, l'une des copies du terminus reste au centre de la cellule pendant que l'autre copie de la région migre au pôle d'une des futures cellules filles. Ce profil suggère que la région terminale s'étire sur toute la longueur du nucléoïde (Wang et al., 2006)(Wiggins et al., 2010).

De façon remarquable dans la plupart des conditions de croissance, les deux copies de la région *Ter* restent au centre de la cellule après leur réplication. Leur séparation est effective juste avant la division cellulaire (Niki et al., 2000) (Li et al., 2002) (Bates and Kleckner, 2005) (Nielsen et al., 2006a) (Espeli et al., 2008).

5. Dynamique de ségrégation des plasmides bactériens

Les plasmides sont des éléments génétiques extra chromosomiques avec un nombre de copies compris entre 1 et une centaine. Ils sont pour la plupart non-essentiels à la survie des bactéries mais ils sont souvent porteurs de déterminants génétiques qui offrent un avantage sélectif aux bactéries hôtes dans un environnement particulier. Les plasmides sont majoritairement des molécules d'ADN circulaires de petites tailles mais ils peuvent aussi être

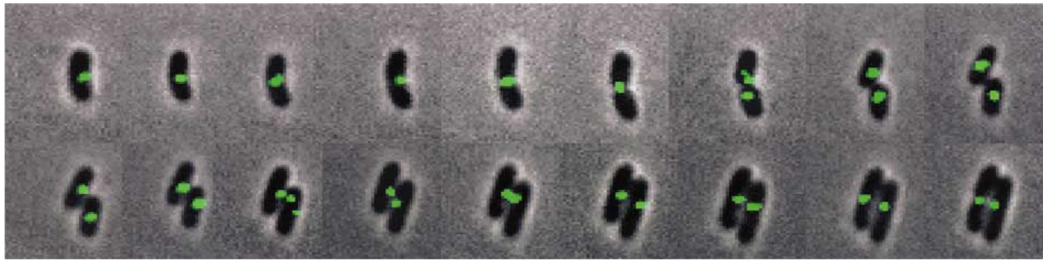


Figure 7 : Suivi au cours du temps de la localisation intracellulaire du plasmide mini-P1

Le plasmide mini-P1 est observé par l'intermédiaire de la protéine de fusion GFP_ParB qui se fixe aux sites *parS* insérés sur le plasmide (Li and Austin, 2002).

sous forme linéaires. Leur taille varie de quelques kb à plusieurs Mb. L'initiation de la réplication est régulée par des séquences présentes sur les plasmides : une séquence *ori* reconnue par une ou plusieurs protéines Rep. La réplication est assurée par l'ADN polymérase de l'organisme hôte. La réplication progresse de manière uni- ou bidirectionnelle. Les plasmides sont répartis en deux groupes :

- bas nombre de copies, comme les plasmides F ou P1 d'*E. coli*, présent suivant le milieu de croissance en 1 à 5 copies par cellule.
- haut nombre de copies, comme ColE1, 20 à 30 copies par cellule.

Les plasmides à bas nombre de copies présentent une localisation dynamique très ordonnée dans la cellule qui souligne la présence d'un mécanisme actif impliqué dans la ségrégation des plasmides. Cette fonction est assurée par les systèmes de partition. Les systèmes de partition ont un rôle primordial dans la ségrégation des plasmides, ils vont assurer la bonne répartition des plasmides avant la division cellulaire. Les systèmes de partition sont répartis en trois classes :

- la classe de type I avec une ATPase (ParA), des protéines de liaison (ParB) et un site centromérique (*parS*) pour les plasmides F et P1
- la classe de type II avec une NTPase (ParM) de type actine, une protéine de liaison au centromère (ParR) et un centromère (*parC*) pour le plasmide R1 d'*E. coli*.
- la classe de type III avec une GTPase de type tubuline

Les plasmides F et P1 se localisent au centre de la cellule en condition de croissance rapide. Après duplication, ils migrent rapidement vers les futurs centres des cellules filles où ils sont maintenus (Gordon et al., 1997) (Gordon et al., 2004). En condition de croissance lente, l'étude du plasmide P1 montre que la majorité des cellules ne présente qu'un seul focus central. Avant la division cellulaire, lorsque le septum est quasiment refermé, le focus se divise en deux foci qui vont être éjectés à l'opposé l'un de l'autre suivant l'axe de la cellule (Figure 7). L'étape d'éjection est dépendante de ParA et la capture au septum de division nécessite ParB et *parS* (Li et al., 2004) (Hatano and Niki, 2010). Après division de la cellule, le focus devient très mobile pouvant se scinder en deux foci puis reformer un focus (Figure 7). La capture au centre de la cellule est tardive au cours du cycle cellulaire de l'organisme hôte, juste avant le prochain événement de division (Li and Austin, 2002) (Li et al., 2002). Les auteurs interprètent leurs observations en suggérant que les plasmides forment un « cluster » quand ils sont regroupés dans un même focus, une copie de plasmide peut se

dissocier puis ensuite réintégrer le « cluster ». C'est pourquoi, malgré le nombre de copies de plasmides dans la cellule, on observe un unique focus. La formation du « cluster » de plasmides ne semble pas être influencée par le système *par*. En effet, ce phénomène est aussi observé chez les plasmides à haut nombre de copies ne possédant pas de système de partition.

Cependant, la présence de tous les éléments du système de partition est essentielle pour la localisation des plasmides et leur absence conduit à une distribution aléatoire des plasmides dans les cellules (Jensen and Gerdes, 1999) (Niki and Hiraga, 1997). Il semble que chaque copie de plasmide doit être positionné de sorte que les plasmides puissent être orientés de part et d'autre de la cellule et ne se retrouvent pas dans la même future cellule fille. Ainsi, les plasmides partitionnés activement, seraient attachés ensemble ou appariés par l'intermédiaire de leur système de partition. Cette hypothèse de l'appariement par les système *par* donne une explication à l'incompatibilité des plasmides utilisant les mêmes mécanismes de ségrégation (Austin and Nordström, 1990) (Bouet et al., 2007). Dans le cas du plasmide R1, l'appariement des plasmides a pu être observée par microscopie électronique (Jensen et al., 1998) (Figure 7). L'appariement nécessite la protéine de liaison à l'ADN ParR et est stimulé par l'ATPase ParM et l'ATP.

6. La cohésion des chromosomes chez les bactéries

De nombreuses expériences suggèrent qu'après la réplication, des loci des chromosomes bactériens restent proche l'un de l'autre durant quelques minutes. La durée de cette période varie en fonction de nombreux éléments : le milieu de croissance, le type de cycle cellulaire, et le contexte génétique de la souche d'*E. coli* considérée (Adachi et al., 2008). Les analyses des loci ciblés avec des FROS par microscopie à fluorescence révèlent que pour beaucoup de positions, plusieurs minutes s'écoulent entre le moment estimé de la réplication et le moment où la séparation spatiale des loci est observable (Espeli et al., 2008) (Nielsen et al., 2006a). Sur des cellules synchronisées, d'autres équipes ont révélé une colocalisation prolongée des deux chromatides sœurs ensemble après réplication (Sunako et al., 2001) (Bates and Kleckner, 2005). Il est toutefois important de signaler que dans certaines conditions expérimentales ou pour certains loci particuliers (par exemple les régions Non-Structured (NS)) une colocalisation très courte des chromatides sœurs a été observée (Espeli et al., 2008) (Reyes-Lamothe et al., 2008). Il semble donc que la séparation des deux signaux fluorescents en deux foci est synonyme de ségrégation et non de réplication.

Les régions proches de l'origine de réplication et du terminus semblent présenter une période de maintien plus longue que le reste du chromosome (Nielsen et al., 2006a) (Adachi et al., 2008) (Hiraga, 2000). Le reste du chromosome semble suivre une ségrégation progressive quelques minutes après le passage de la réplication (Sunako et al., 2001) (Espeli et al., 2008).

Récemment, deux régions qui semblent contrôler la colocalisation des chromatides sœurs ont été identifiées. Ces régions appelées Snaps, pour rappeler leur particularité de « bouton-pression », sont situées à quelques centaines de kb de l'origine de réplication. Elles sont les dernières régions à être séparées après une longue période de colocalisation, leur séparation entraîne la ségrégation d'une grande région d'ADN située autour de l'origine de réplication (Joshi et al., 2011). La séparation des SNAPs permettrait la ségrégation du chromosome. Les SNAPs sont intégrées dans un modèle où la force motrice de la ségrégation du chromosome est générée par la répulsion des deux chromatides sœurs (Bates and Kleckner, 2005) (Joshi et al., 2011).

La période de colocalisation des différentes régions chromosomiques semble liée à l'organisation du génome en grandes régions structurées appelées macrodomaines. En effet, les quatre macrodomaines présentent un long d'intervalle entre réplication et ségrégation contrairement aux deux régions non-structurées qui en sont pratiquement dépourvues (Espeli et al., 2008).

Plusieurs auteurs ont choisi de nommer ce phénomène sous le terme de cohésion pour rappeler l'étape de cohésion des chromatides sœurs que l'on retrouve entre la phase de réplication et la mitose chez les cellules eucaryotes.

III. La cohésion des chromatides sœurs chez les eucaryotes

Durant le cycle cellulaire eucaryote, la phase de ségrégation des chromosomes est découplée de la phase de réplication. Au cours de la phase G2, les chromatides sœurs sont maintenues cohésives jusqu'à leur séparation en anaphase : c'est la cohésion des chromatides sœurs. Le complexe des cohésines est le principal mécanisme moléculaire connu responsable du maintien de la cohésion des chromatides sœurs.

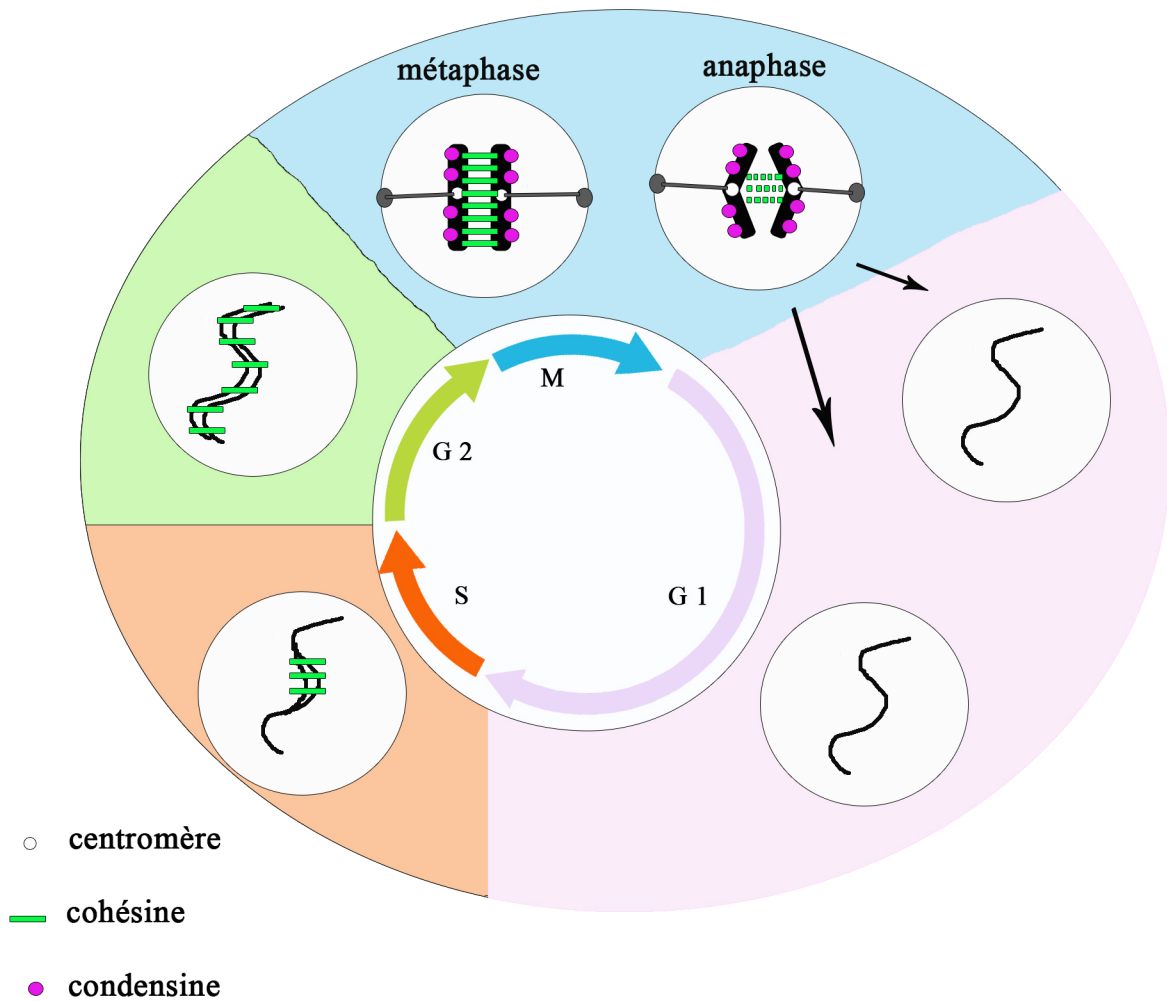


Figure 8 : La cohésion des chromatides soeurs durant le cycle cellulaire des chromosomes eucaryotes

Dans les cellules eucaryotes, le lien entre les molécules d'ADN dupliquées, la cohésion, est établie durant la phase S et maintenue tout au long de la phase G 2.

Le complexe de cohésion est représenté par des rectangles. Pendant la mitose, la cohésion est abolie et les complexes de condensine viennent se charger sur l'ADN pour former les chromosomes condensés en métaphase.

Le clivage total des cohésines permet la séparation finale des chromatides soeurs en anaphase.

1. La cohésion des chromatides sœurs

La cohésion des chromatides sœurs a plusieurs rôles dans le cycle cellulaire. Le principal semble être le maintien de l'intégrité génétique lors de la division cellulaire. En effet, elle est un élément indispensable à la distribution correcte des chromatides sœurs dans les cellules filles (Nasmyth and Haering, 2009). Les chromatides sœurs cohésives sont reconnues par les microtubules du fuseau lors de la mitose via les kinétochores. Les kinétochores sont des macro-complexes protéiques assemblés au niveau du centromère de chaque chromatides. En mitose, les kinétochores interagissent avec des microtubules provenant des deux pôles opposés du fuseau. Les forces alors exercées par les microtubules permettent l'organisation des chromosomes en plaque équatoriale. En anaphase, ces forces tendent à séparer les deux chromatides sœurs encore maintenue ensemble par la cohésion. La tension générée participe à l'orientation correcte et bipolaire des chromatides sœurs sur le fuseau mitotique (Figure 8) (Tanaka, 2002).

La cohésion des chromatides sœurs se compose de trois étapes : la mise en place de la cohésion, le maintien de la cohésion et enfin la perte de la cohésion par clivage des protéines de liaison appelées cohésines (Figure 8).

Le chargement des cohésines sur la chromatine nécessite l'intervention du complexe Scc2/Scc4. La réaction de chargement n'est pas clairement définie mais on sait que ce complexe, appelé complexe de chargement des cohésines, est essentiel pour l'association des cohésines sur la chromatine. La localisation des complexes de chargement chez *Saccharomyces cerevisiae* se fait par points discrets le long des bras des chromosomes. Ils sont également retrouvés aux télomères et aux centromères. Les sites de localisation des complexes de chargement correspondent à des zones de forte activité transcriptionnelle (Lengronne et al., 2006). D'autres études chez *Saccharomyces pombe* et chez la drosophile montrent les mêmes résultats sur la localisation aux points de forte transcription du complexe de chargement des cohésines. Les auteurs suggèrent que la transcription pourrait faciliter l'association des complexes de chargement en fournissant peut être un niveau de décompaction de la chromatine adéquat (Misulovin et al., 2008).

En revanche, les cohésines n'occupent pas les mêmes sites que les complexes de chargement. On retrouve préférentiellement les cohésines dans les régions péri-centromériques (Lengronne et al., 2004). Les cohésines seraient initialement localisées aux sites occupés par les complexes de chargement puis déplacées par l'activité transcriptionnelle

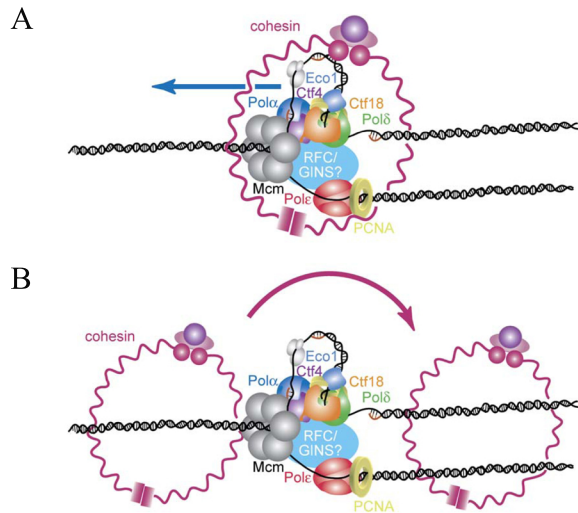


Figure 9 : Modèles de chargement des cohésines sur l'ADN au cours de la réplication

A. La fourche de réplication glisse à travers l'anneau de cohésine. La fourche de réplication est représentée grossièrement à l'échelle mais la structure tridimensionnelle du complexe de réplication n'est pas connue.

B. L'autre modèle suggère que la cohésine perd son contact topologique avec l'ADN lors du passage de la fourche de réplication. Les facteurs qui vont permettre l'établissement de la cohésion, maintiennent l'anneau cohésine près de la fourche de réplication. Ils permettent ainsi de réassocier le complexe cohésine avec les produits de réplication après le passage des fourches avant la réplication ou pendant la réplication (Lengronne et al, 2006)

pour s'accumuler dans les zones intergéniques de paires de gènes convergents (Lengronne et al., 2004). Chez les levures *S. cerevisiae* et *S. pombe*, les régions liées par les cohésines, les CARs (pour « Cohesin-Associated Region ») sont distribuées en moyenne tous les 15 kb (Lengronne et al., 2004). Ces régions ne portent pas de séquence spécifique, mais sont majoritairement retrouvées dans les régions intergéniques. Il semble que la transcription joue un rôle important dans la localisation des cohésines. D'autres facteurs additionnels contribuent au chargement ou au maintien des cohésines en des régions particulières du génome et notamment des marques sur la chromatine. Les études sur ce sujet sont encore en cours.

Le chargement des cohésines sur la chromatine peut se faire tout au long du cycle cellulaire. Mais le recrutement des cohésines n'est pas suffisant à l'établissement de la cohésion. L'établissement de la cohésion au cours du cycle cellulaire est restreint à la phase S (Lengronne et al., 2006). Cela suggère qu'il existe un couplage entre la réplication de l'ADN et l'établissement de la cohésion des chromatides sœurs. Deux modèles sont proposés (Figure 9). Tout d'abord, les cohésines préalablement chargées sur la chromatine seraient en conformation ouverte puis le passage de la fourche de réplication induirait la fermeture de la structure protéique. Alternativement, la cohésion pourrait être établie lors du passage de la fourche de réplication qui charge les complexes cohésines sur l'ADN néo-synthétisé. Ces mécanismes permettraient d'assurer que ce sont bien deux chromatides sœurs qui sont encerclées par l'anneau de cohésine (Lengronne et al., 2006). Cependant il est difficile de concevoir comment la fourche de réplication passe à travers l'anneau de cohésine. Et si c'est le cas, l'organisation de la chromatine devient un défi pour garantir le passage de la fourche de réplication.

Le maintien de la cohésion des chromatides sœurs dépend également d'autres facteurs protéiques comme la protéine Psd5. La protéine Psd5 serait un composant structural du complexe cohésine chez *S. cerevisiae*. Psd5 est impliquée dans le maintien de la cohésion en interphase (Vaur et al., 2012). En effet, en l'absence de Psd5, les chromatides sœurs associées en phase exponentielle de croissance se séparent progressivement au cours d'un arrêt en phase G2. Les cellules subissent alors une ségrégation anormale de leurs chromosomes, causant la létalité de la descendance (Vaur et al., 2012).

En fin, lors de la mitose, la perte de la cohésion provoque la ségrégation des chromosomes. Chez la levure, l'abolition de la cohésion est faite en une seule étape lors de la

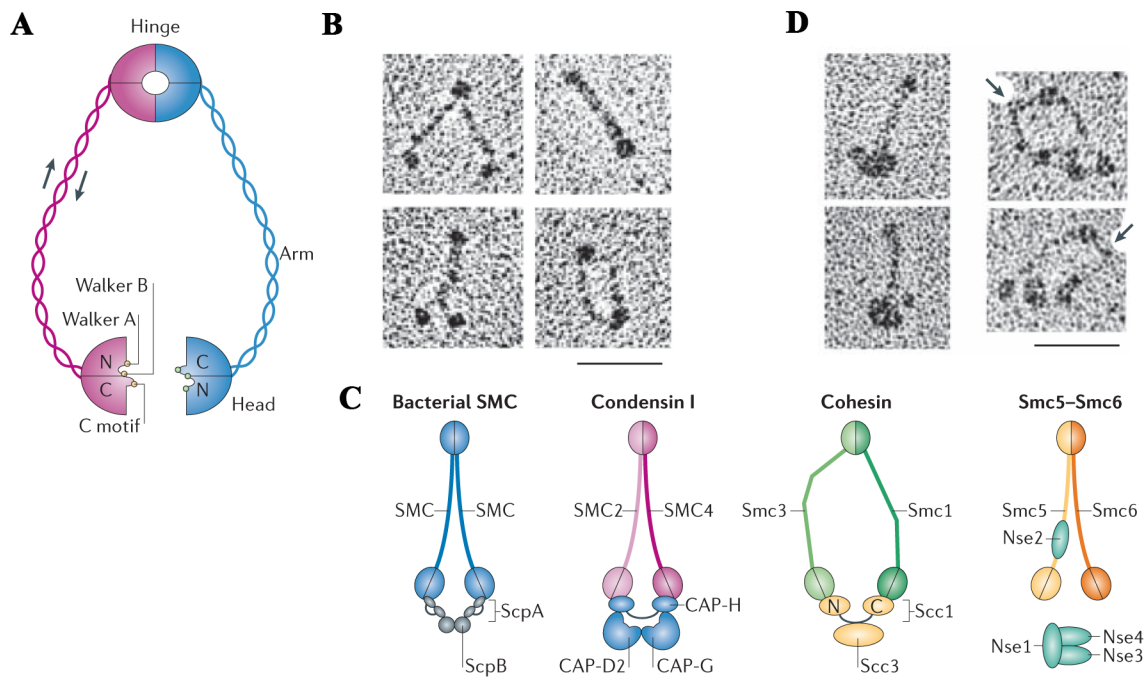


Figure 10 : Architecture des protéines SMC et des complexes protéiques SMC

A. L'architecture basique des protéines SMC en dimère. Chaque sous-unité protéique est repliée pour former une interaction anti-parallèle des bras coiled-coil. Le complexe forme une pince moléculaire par l'interaction des têtes flexibles des deux sous-unités. Les extrémités opposées portent la liaison à l'ATP.

B. Microscopie électronique des homodimères SMC de *B. subtilis* sous plusieurs conformations. L'échelle représente 50nm.

C. Représentation de l'architecture des complexes protéiques SMC chez les bactéries et les eucaryotes. Les complexes SMC bactériens sont composés d'un homodimère SMC lié par deux protéines non-SMC; ScpA, la kleisine, et ScpB chez *B. subtilis*. Les condensines sont formées d'un hétérodimère SMC2-SMC4 en complexe avec les protéines CAP-H, CAP-D2 et CAP-G. Les cohésines sont formées d'un hétérodimère SMC1-SMC3 auquel se fixe la kleisine Scc1 et la protéine Scc3. L'hétérodimère SMC5-SMC6, impliqué dans la réparation de l'ADN, se fixe aux protéines Nse1-4.

D. Exemples d'images des complexes cohésine et condensine purifiés prise au microscope électronique (Hirano T., 2006)

	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>	<i>Drosophila melanogaster</i>	<i>Xenopus laevis</i>	<i>Homo sapiens</i>
Cohesin						
SMC1	Smc1	Psm1	HIM-1	SMC1	SMC1	SMC1 α
SMC3	Smc3	Psm3	SMC-3	SMC3	SMC3	SMC3
SCC1	Scc1/Mcd1	Rad21	SCC-1/COH-2	Rad21	RAD21	RAD21
SCC3	Scc3	Psc3	SCC-3	SA	SA1, SA2	SA1, SA2
REC8 (meiosis-specific SCC1)	Rec8	Rec8	REC-8	–	–	REC8
Condensin						
SMC2	Smc2	Cut14	MIX-1 (MIX-1)*	SMC2 [†]	CAP-E	CAP-E
SMC4	Smc4	Cut3	SMC-4 (DPY-27)*	SMC4/gluon	CAP-C	CAP-C
CAP-D2	Ycs4	Cnd1	HCP-6 [†] (DPY-28)*	CG1911 [†]	CAP-D2/Eg7	CAP-D2/CNAP1
CAP-G	Ycs5/Ycg1	Cnd3	–	CG17054 [†]	CAP-G	CAP-G
CAP-H	Brn1	Cnd2	(DPY-26)*	Barren	CAP-H	CAP-H
DNA repair						
SMC5	Smc5 (YOL034w)	Spr18	C27A2.1 [†]	CG3248 [†]	SMC5 [†] (AB103030.1)	SMC5
SMC6	Smc6/Rhc18	Rad18	C23H4.6 [†] F54D5.14 [†]	CG5524 [†]	SMC6 [†] (AB103031.1)	SMC6
NSE1	Nse1	–	–	–	–	NSE1 [†]

**Caenorhabditis elegans* contains a second condensin-like complex that functions in X-chromosome dosage compensation. [†]Proteins that have been identified by homology, but have not yet been shown to be members of the complex.

Tableau 1 : Les complexes de protéines SMC

Tableau récapitulatif des différents complexes protéiques formant avec les protéines SMC les cohésines, les condensine et les complexes de réparation de l'ADN présents chez les cellules eucaryotes (Hagstrom K. and Meyer B. J., 2003).

transition métaphase-anaphase. D'ailleurs, lors de cette étape, les cohésines sont clivées par l'action de la séparase Esp1 pour déclencher l'anaphase (Uhlmann, 2004).

Les complexes SMC (Structural Maintenance of Chromosomes) sont impliqués dans plusieurs aspects de la dynamique de la chromatine des cellules bactériennes et eucaryotes.

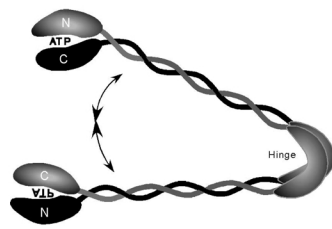
Chez les eucaryotes la famille des protéines SMC est composée de 6 sous classes (Smc1 à Smc6). Les six protéines forment trois hétérodimères différents qui portent chacune une fonction spécifique. Les protéines SMC2 et SMC4 forment le complexe des condensines qui a un rôle central dans la ségrégation et l'assemblage des chromosomes. Les protéines SMC1 et SMC3 forment le complexe des cohésines qui est essentiel pour la cohésion des chromatides sœurs. Enfin, le complexe protéique SMC5/SMC6 est impliqué dans la réparation de l'ADN et les réponses aux check points (Tableau 1).

2. Acteurs de la cohésion des chromatides sœurs

a. Les condensines

Une protéine SMC peut être identifiée par la présence de 5 domaines de propriétés spécifiques. Le domaine N-terminal est composé d'un motif Walker A et un motif de liaison à l'ADN. Le domaine se lie de façon spécifique à l'ADN double brin riche en A-T. Le domaine C-terminal est composé d'une « DA-box » avec une séquence Walker B-like et un motif signature LSGG qui est typique de la famille des protéines ATPases. Le domaine de liaison à l'ADN et le domaine catalytique sont reliés par deux domaines coiled-coil séparés par une jonction flexible (pour revue (Hirano, 2002)). La région flexible est constituée de quatre résidus glycine fortement conservés, une séquence consensus $G(X)_6G(X)_3GG$ que l'on retrouve chez les protéines SMC procaryotes. Les résidus glycine contribue à la flexibilité des molécules SMC pour permettre l'ouverture et la fermeture de la structure protéique. La région flexible est également nécessaire et suffisante pour promouvoir la dimérisation spécifique entre protéines SMC différentes. Les domaines coiled-coil interagissent de façon intramoléculaire pour rapprocher un motif Walker A à un motif Walker B et former ainsi un domaine ATPase actif (Figure 10)(Haering et al., 2002) (Hirano et al., 2001). Le domaine coiled-coil a la capacité de lier l'ADN. Le dimère qui en résulte est en forme de V dont l'angle varie : plus étroit pour les condensines que pour les cohésines (Anderson et al., 2002) (Figure 10).

A



B

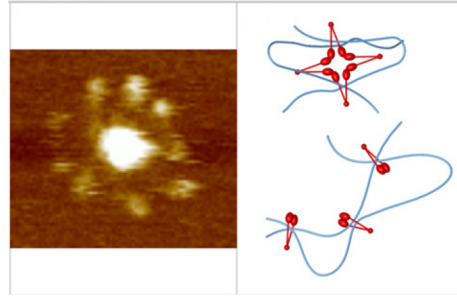


Figure 11: Le complexe SMC bactérien et son modèle de fixation sur l'ADN

A. Représentation de l'homodimère MukBEF. La protéine MukB est formée de deux domaines ATPasiques portés par la région C-terminale et N-terminale, et de deux domaines coiled-coil, séparés par une région flexible. Après repliement de la protéine, les domaines ATPasiques se retrouvent en face l'une de l'autre. L'homodimère est formé par interaction des parties flexibles de chaque protéine.

B. Image de microscopie à force atomique du complexe SMC avec l'ADN. Le complexe semble former une structure en rosette comme schématisée ici.

Chez *S. cerevisiae*, quatre gènes SMC ont été identifiés, tous essentiels à la viabilité de la cellule (Strunnikov et al., 1993). Quatre autres protéines, orthologues, sont présentes chez les mammifères, les amphibiens et les nématodes.

Le complexe condensine est constitué de deux protéines SMC (CAP-C/Smc4 et CAP-E/Smc2), et de trois protéines non SMC (CAP-D2, CAP-G et CAP-H). Toutes les sous-unités du complexe sont requises pour l'organisation et la ségrégation du chromosome, essentielle à la viabilité des cellules. Le complexe possède une activité ATPase stimulé par la présence d'ADN.

La séquence des SMC est très conservée à travers différentes espèces. Il semble que la différence dans leur séquence reflète la capacité à lier des sous-unités différentes. Les protéines SMC et les sous-unités associées semblent être spécialisées dans des fonctions intracellulaires particulières.

Comme chez les eucaryotes chaque génome bactérien présente plusieurs protéines de type SMC, par exemple chez *E. coli* : le complexe MukBEF, le complexe SbcCD et la protéine RecN (Melby et al., 1998)(Mascarenhas et al., 2006)(Sanchez and Alonso, 2005) et chez *P. aeruginosa*: les complexes SMC et MksBEF (Petrushenko et al., 2011). Le complexe SMC/MukBEF est mieux caractérisé. Il joue un rôle dans la condensation globale du chromosome, en formant des multimères de protéines pour rapprocher deux loci distants (Figure 11). Découvert lors d'une analyse de mutants qui produisent des cellules anucléées, MukBEF semble être impliqué dans la ségrégation du chromosome (Niki et al., 1991).

Le complexe SMC/MukBEF forme des foci discrets dans la cellule (Ohsumi et al., 2001) et la localisation de ces foci a longtemps été controversée. Il est maintenant admis que le complexe colocalise avec les régions origines d'*E. coli* et de *B. subtilis* pendant le cycle cellulaire de façon indépendante de la réplication (Danilova et al., 2007) (Gruber and Errington, 2009). Chez *B. subtilis*, le recrutement du complexe SMC aux régions origines apparaît être médié par le système ParB/*parS* localisé dans cette région (Gruber and Errington, 2009) (Sullivan et al., 2009). Le recrutement du complexe SMC par le système de partition suggère que l'activité de SMC est cruciale pour la ségrégation de la région origine.

Les approches *in vitro* ont démontré le rôle de condensine des protéines SMC bactériennes. Par une approche de single-molécule, MukB apparaît comme une pince macromoléculaire qui peut condenser l'ADN de manière ATP-dépendante (Cui et al., 2008).

De plus, le complexe MukBEF stabilise le surenroulement négatif sur les plasmides *in vitro* (Petrushenko et al., 2006).

La protéine MukB d'*E. coli*, possède des domaines globulaires à chaque extrémité séparés par des hélices α . En solution, la protéine forme un homodimère 'antiparallèle' et permet le rapprochement des extrémités de la terminaison carboxyle (C-terminal) et de la terminaison amine (N-terminal) de chaque sous-unité du complexe protéique (Figure 11) (Niki et al., 1991)(Niki et al., 1992) (Yamazoe et al., 1999). Les extrémités globulaires porte une activité de liaison à l'ATP/GTP et à l'ADN et une activité ATPase/GTPase (Niki et al., 1992). Le domaine C-terminal participe à la formation du complexe avec les sous unités MukE et MukF (Figure 11). Une mutation au niveau des sous unités MukE et MukF affecte la localisation en foci de la protéine MukB.

a. Les cohésines

Chez les eucaryotes, les cohésines sont essentielles pour la cohésion des chromatides sœurs. Les différentes sous-unités du complexe cohésine ont été mises en évidence chez la levure (Strunnikov et al., 1993) (Guacci et al., 1997). Elles sont composées de deux protéines SMC, Smc1 et Smc3, associées à des protéines non-SMC, Scc1 et Scc3 (Figure 10C). La kleisine Scc1 se lie aux domaines globulaires des protéines Smc1 et Smc3 formés par l'association des domaines C-terminal et N-terminal des protéines SMC. Scc3 ne semble pas lier directement les protéines SMC mais se lie à la protéine Scc1.

Le complexe cohésine a une structure en forme de V que l'on retrouve dans les autres complexes SMC tels que les condensines. Cependant leur conformation est très différente (Anderson et al., 2002). La région charnière des cohésines est largement ouverte et les régions du coiled-coil s'écartent l'une de l'autre pour laisser un grand espace libre dans le complexe. Au contraire, la région charnière des condensines est fermée et l'espace entre les régions coiled-coil est restreint. (Figure 10C)

Chez les bactéries une seule protéine SMC avec une activité cohésine a été identifiée à ce jour, la protéine RecN de *Deinococcus radiodurans* (Reyes et al., 2010). RecN de *D. radiodurans* stimule la ligation intermoléculaire de molécules d'ADN linéaires. Chez *E. coli*, l'expression de RecN est contrôlée par le régulon SOS. Son rôle dans la réparation de l'ADN n'est pas encore compris.

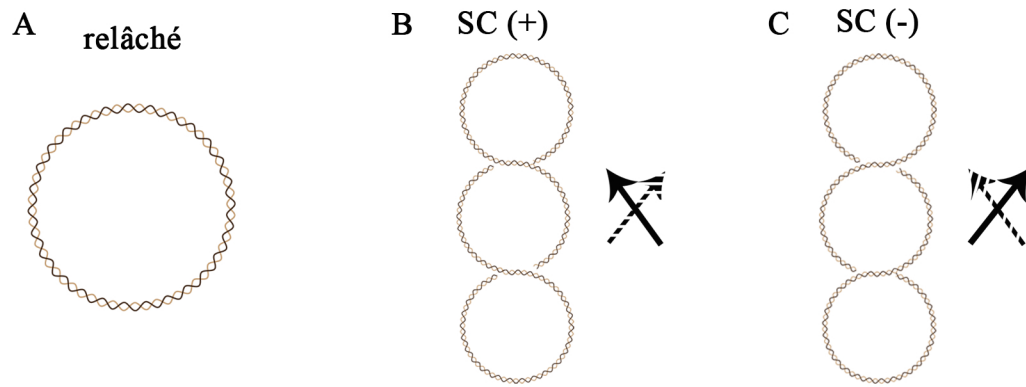


Figure 12 : Les différents états d'une molécule d'ADN circulaire

Schémas représentant la molécule d'ADN circulaire dans les différents états topologiques :

relâché,

surenroulée positivement (SC(+)),

surenroulée négativement (SC(-)).

Le sens des flèches pleine indique le sens du surenroulement.

IV. Ségrégation / cohésion dans le contexte d'une molécule structurée

Pour une protéine donnée, il est très difficile de distinguer son rôle potentiel dans la condensation de l'ADN d'un rôle direct dans la ségrégation. L'intrication entre condensation et ségrégation s'observe par exemple pour les condensines dont la fonction principale est de condenser l'ADN en mitose. Si on altère leur activité, les chromosomes eucaryote ou procaryote présentent un défaut de condensation mais aussi un défaut de ségrégation (Hirano, 2005) (Hirano and Hirano, 2004). Des études récentes suggèrent que les actions des condensines et des cohésines sont liées. Chez les bactéries, au départ de ce travail de thèse, il n'était pas encore connu si la phase de colocalisation des chromatides sœurs étaient coordonnée avec une modification de la condensation ou de l'organisation du chromosome. Les résultats présentés dans ce manuscrit proposent une organisation particulière des chromatides sœurs adaptée aux minutes qui suivent leur réplication. Les paragraphes suivants décrivent les éléments de structuration des chromosomes bactériens nécessaires pour appréhender mes résultats.

1. Structure topologique

Chez les bactéries mésophiles, la compaction de l'ADN repose sur deux éléments : le surenroulement libre négatif de la molécule d'ADN par les topoisomérases et la formation de complexes nucléoprotéiques (où surenroulement contraint) comparables aux nucléosomes des eucaryotes (Holmes and Cozzarelli, 2000). Le surenroulement de l'ADN peut être défini comme étant une des conformations qu'adopte l'ADN dans l'espace. Lorsque la double hélice d'ADN s'enroule autour d'elle même, elle forme des supertours et devient surenroulée. L'ADN peut se trouver dans plusieurs états distincts : relâché, lorsque la double hélice ne possède aucun surenroulement ; surenroulé positivement, lorsque le surenroulement se fait dans le sens de la rotation de la double hélice ; et surenroulé négativement, lorsque le surenroulement de l'ADN se fait dans le sens opposé par rapport à la rotation de la double hélice (Figure 12). Chez la plupart des organismes vivants, dont *E. coli*, l'ADN est surenroulé négativement, ce qui permet de condenser l'ADN et de faciliter l'ouverture des brins. D'autres organismes présentent une molécule d'ADN surenroulée positivement comme chez

les archées hyper-thermophiles pour protéger leur ADN des hautes températures et ainsi éviter l'ouverture de la double hélice (Rodríguez and Stock, 2002).

La particularité du chromosome circulaire impose des contraintes qui sont décrites par l'équation de Vinograd et Lebowitz : $Lk = Tw + Wr$. Dans cette équation, Lk (linking number) est constant et représente le nombre de fois que les deux brins d'ADN se croisent. Tw (« twist ») désigne la torsion d'un brin d'ADN autour de l'autre et reflète les variations du pas de l'hélice d'ADN, le nombre de tours de la double hélice. Wr (« Writhe ») est la rotation de la double hélice autour d'un axe qui correspond au nombre de fois où la molécule d'ADN va s'entrecroiser, le nombre de supertours. Wr et Tw sont des grandeurs géométriques associées aux paires de bases, alors que Lk est une valeur topologique invariante, entière, dont le sens est pris sur la molécule globale. Sur un chromosome circulaire, la seule possibilité de faire varier le Lk est de générer une coupure d'une liaison phosphodiester sur un ou sur les deux brins de la molécule d'ADN.

La relation $Lk = Wr + Tw$ signifie donc que toute variation du nombre d'entrelacements va se répartir entre une création ou une annulation de supertours et une variation du pas de la double hélice. Inversement, tant qu'aucun des deux brins d'ADN n'est interrompu, une contrainte externe exercée sur le Wr ou le Tw sera nécessairement compensée par un ajustement de l'autre.

a. Surenroulement libre

Le fait qu'une grande partie du chromosome soit surenroulée librement est spécifique des bactéries. Le surenroulement libre est une conformation dont la topologie ne dépend pas de la liaison de protéines sur l'ADN. Chez *E. coli*, l'ADN surenroulé a une densité de $\sigma = -0,06$ et 40% de celui-ci est sous forme libre soit $\sigma = -0,024$ (Bliska and Cozzarelli, 1987). Les surenroulements libre et contraint sont en équilibre dans la molécule d'ADN et en conséquence, des modifications du surenroulement contraint peuvent modifier le surenroulement libre et vice versa. Le surenroulement libre est en permanence modulé par les topoisomérases et le métabolisme de l'ADN (Wang, 1984).

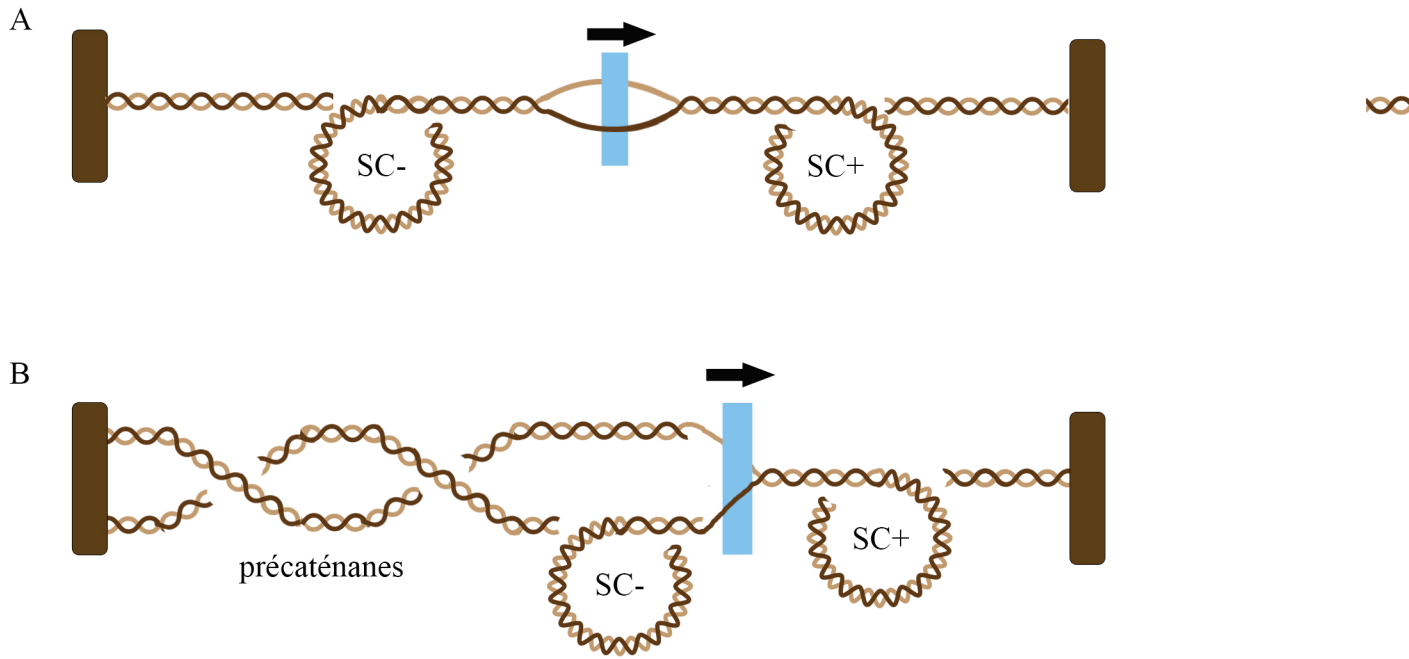


Figure 13: Modèle de contrainte topologique induite par la transcription et la réplication.

A. Lors de la transcription, l'ouverture du duplexe d'ADN entraîne l'accumulation de supertours positifs devant la polymérase et de supertours négatifs derrière la polymérase.
 B. Lors de la réplication, la séparation du duplexe d'ADN entraîne la formation de supertours positifs devant la fourche. Le surenroulement positif accumulé peut être compensé par l'entrelacement des deux duplexes d'ADN nouvellement répliqués derrière la fourche (les précaténanes) (Wang, 2002)

b. Le surenroulement est modifié localement par la réplication et transcription

La réplication et la transcription sont des mécanismes qui vont induire l'ouverture de la double hélice d'ADN. La séparation des deux brins d'ADN entraîne une contrainte topologique. En effet l'ouverture de la double hélice va entraîner une modification du Twist et être compensée par la formation de surenroulement positif devant les complexes et de supertours négatifs en aval (Figure 13) (Liu and Wang, 1987) (Postow et al., 1999). En considérant que les complexes de transcription ou de réplication ne peuvent tourner autour de l'ADN pour absorber les changements de Lk, chaque fois que la polymérase avance d'un tour d'hélice (10,1pb) un supertour positif est généré en amont du complexe (Rahmouni and Wells, 1992). Lors de la réplication une autre conformation topologique a été observée, il s'agit du tressage des chromatides sœurs sous forme de précaténanes (Sundin and Varshavsky, 1981). Les précaténanes pourraient servir à absorber un excès de surenroulement positif généré devant les fourches (Figure 13). Les précaténanes ont été observées *in vivo* sur des plasmides de petite taille chez *E. coli* (Peter et al., 1998) et dans des extraits d'œuf de Xenope (Lucas et al., 2001). Leur existence n'est pas démontrée sur des chromosomes. Si les précaténanes ne sont pas résolus avant la fin de la réplication, il y aura formation de caténanes qui créent un lien physique entre les deux chromosomes nouvellement répliqués (Espeli and Mariani, 2004). La cellule doit donc contenir et éliminer régulièrement les modifications locales de la topologie. Les topoisomérases assurent cette fonction.

c. Les plectonèmes où microdomaines de surenroulement

Le surenroulement libre peut se présenter sous la forme de plectonèmes où la torsion est répartie intermoléculairement sous une forme de boucle (Figure 14). La structure de plectonèmes permet la condensation de l'ADN et le coulissement de l'ADN dans cette structure. Une grande partie du surenroulement négatif serait sous cette forme dans la cellule (Boles et al., 1990).

Le chromosome d'*E. coli* est défini depuis longtemps comme possédant des territoires. Les travaux de Pettijohn et ses collègues en 1981 puis ceux de Staczek et Higgins, montrent que le chromosome d'*E. coli* est surenroulé en petites boucles ou domaines de surenroulement qui peuvent être relâchés indépendamment les uns des autres en présence d'une cassure simple brin ou d'une cassure double brin. Le nombre de domaines est estimé à environ 400

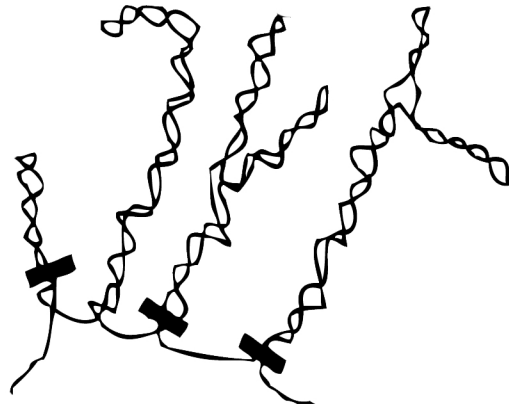


Figure 14 : Représentation des plectonèmes

Les plectonèmes sont des domaines de surenroulement délimités par des barrières topologiques qui empêchent la diffusion de la superhélicité à travers tout le chromosome. La taille des plectonèmes est variable ainsi que la position des barrières topologiques.

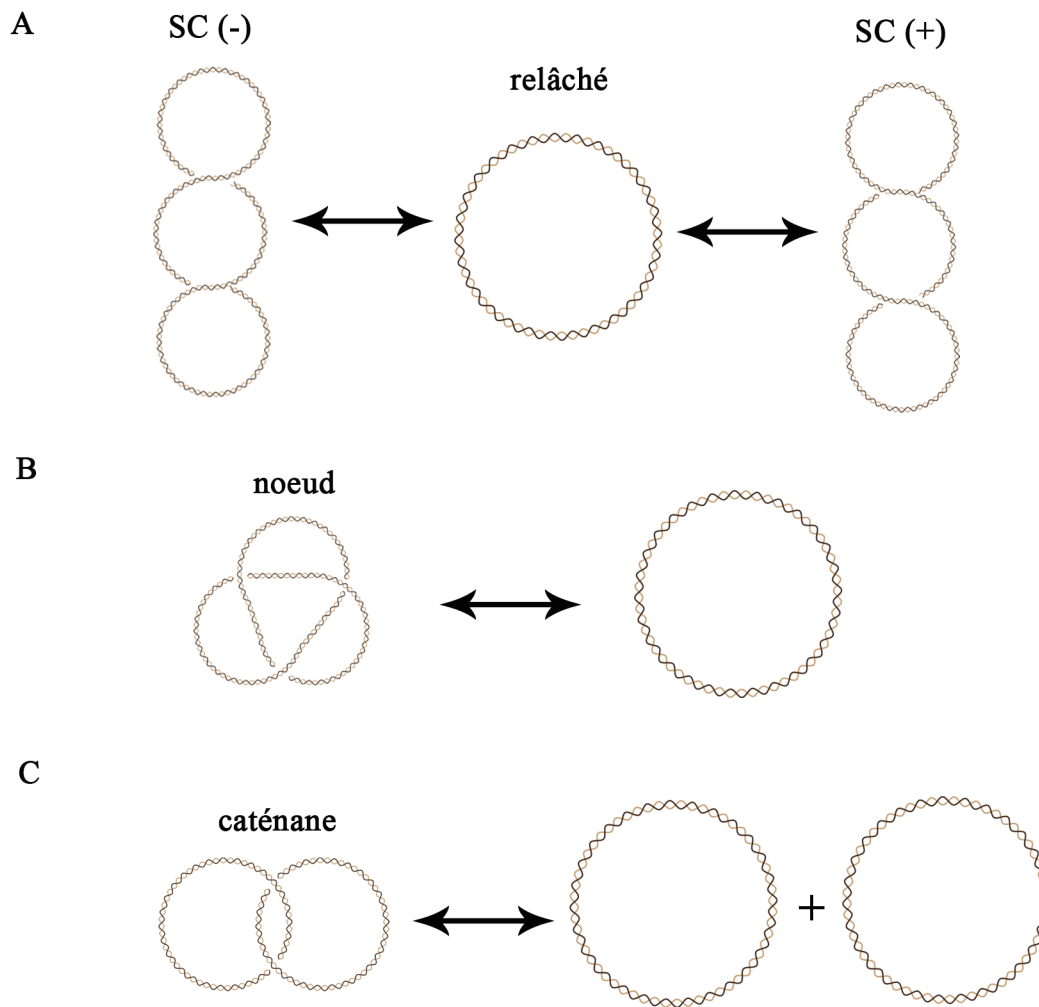


Figure 15 : les différentes activités des topoisomérases de type II

A. Relaxer et introduire du surenroulement dans l'ADN

B. Faire ou défaire des noeuds.

C. Caténer et décaténer l'ADN

(Staczek and Higgins, 1998). La définition de ces domaines indépendants implique la présence de barrières dites barrières topologiques. Les barrières topologiques limiteraient la diffusion du surenroulement et la perte totale de surenroulement délétère pour la cellule. Ces barrières de diffusion du surenroulement sont stochastiques d'une cellule à l'autre mais aussi au cours du cycle cellulaire (Staczek and Higgins, 1998). La taille des boucles de surenroulement dans la cellule peut varier de 10 kb à 50-100 kb suivant les études réalisées. Ces différences sont principalement dues à l'amélioration des techniques employées. La technique de microarray utilisée par Postow et ses collègues, permettant de mesurer le niveau d'expression de gènes sensibles au surenroulement répartis sur le chromosome (Peter et al., 2004). En provoquant *in vivo* des coupures tout au long du chromosome, les auteurs ont analysé les variations d'expression de gènes plus ou moins proche des coupures générées par des enzymes de restriction. Les gènes situés dans le même domaine que la coupure va se retrouver dans un contexte où l'ADN est relâché, leurs variations d'expression traduit une modification du surenroulement. Cette étude montre que le chromosome est organisé en domaines de tailles variables, délimités par des barrières de positions aléatoires distantes d'environ 10 kb (Figure 14).

d. Les topoisomérases

La topologie de l'ADN est contrôlée par des protéines appelées les topoisomérases. Les topoisomérases sont présentes dans tous les domaines du vivant. Ces enzymes contrôlent les variations du surenroulement dans la molécule d'ADN en introduisant une coupure transitoire de l'ADN. Le cycle catalytique des topoisomérases est composé de trois étapes : (i) coupure transitoire d'une liaison phosphodiester de l'ADN et formation d'un complexe entre les extrémités et le site catalytique ; (ii) passage d'une molécule d'ADN intacte (un brin ou deux brins selon le type de topoisomérase) à travers la coupure et (iii) restauration de la liaison phosphodiester de l'ADN initialement rompue. Chaque topoisomérase catalyse une ou plusieurs réactions topologiques spécifiques en fonction du nombre de brins coupés et l'orientation du passage de brin. Les réactions catalysées sont la relaxation des supertours négatifs ou positifs d'une molécule d'ADN, la création de supertours négatifs ou positifs et la modulation des entrelacements topologiques entre deux duplexes d'ADN (Figure 15) (Levine and Marians, 1998). Les topoisomérases sont divisées en deux classes : les topoisomérases de type I qui peuvent couper uniquement un des deux brins de l'hélice d'ADN et les topoisomérases de type II qui peuvent couper les deux brins d'ADN.

Chez *E. coli*, il existe quatre topoisomérases qui influencent la topologie de l'ADN. Deux topoisomérases de type I (la Topoisomérase I et la Topoisomérase III) qui, en coupant un unique brin d'ADN, catalysent les réactions de relaxation de l'ADN ; et deux topoisomérases de type II (l'ADN gyrase et la Topoisomérase IV) qui, en provoquant une cassure double brin, permettent ainsi la relaxation ou le surenroulement négatif de l'ADN ou encore la décaténation des chromosomes fils après réplication.

- Les topoisomérases de type I

Les topoisomérases de type I se caractérisent par le fait qu'elles introduisent une coupure transitoire simple brin et qu'elles forment un complexe covalent avec l'extrémité 5' du brin clivé. Le passage du brin est toujours dans le sens où l'énergie contenue dans la torsion de la molécule d'ADN est libérée.

Ce sont des enzymes monomériques comportant quatre sous-domaines formant une pince capable de s'ouvrir et de se refermer. Elles sont les seules topoisomérases conservées chez l'ensemble des organismes vivants suggérant un rôle clef dans les processus liés à l'ADN (Wang, 2002).

Les deux topoisomérases de type I d'*E. coli*, la topoisomérase I ou TopoI et la topoisomérase III ou TopoIII, sont codées respectivement par les gènes *topA* et *topB*.

Le rôle principal de la TopoI est de relâcher les supertours négatifs et ainsi d'empêcher un surenroulement négatif trop fort de la molécule d'ADN. Le domaine C-terminal est impliqué dans la fixation de l'ADN et le domaine N-terminal dans le clivage et le passage de brin. La protéine forme une structure toroïdale avec une cavité au centre qui reçoit l'ADN double brin (Champoux, 2001). Le passage de brin est induit par la molécule d'ADN elle-même. Avec son énergie, l'ADN va induire les changements conformationnels dans la protéine TopoI, conduisant à son activité.

La TopoIII est présente en faible quantité dans la cellule. *In vitro*, elle élimine les structures caténées et présente une faible efficacité pour la relaxation des surenroulements négatif (DiGate and Marians, 1992). La TopoIII permet également de résoudre les contraintes topologiques générées par la rencontre de deux fourches de réplication convergentes (Suski and Marians, 2008). *In vivo*, des expériences montrent un rôle de la TopoIII sur la ségrégation des chromosomes. En l'absence de TopoIII et de TopoIV, la surexpression de la TopoIV ou de la TopoIII supprime la sensibilité à la novobiocine (inhibiteur des topoisomérases de type

II) (B. A. Perez-Cheeks, C. Lee, R. Hayama, et al., 2012). De plus, la nécessité d'ADN simple brin pour réaliser la décaténation par la TopoIII suggère qu'elle pourrait agir au niveau des fourches de réplication ou des intermédiaires de recombinaison homologue. La TopoIII est présente chez les eucaryotes, son rôle y est mieux caractérisé. Elle est essentielle au traitement des intermédiaires de recombinaison en méiose et lors de réparation de cassures d'ADN en phase S. Chez les eucaryotes, TopoIII fonctionne avec comme partenaires RecQ et RmiI qui sont essentielles pour l'activité TopoIII lors de la recombinaison et qui lui permette également de catalyser *in vitro* une réaction de décaténation sur de l'ADN double brin *in vitro* (Cejka et al., 2012).

- Les topoisomérases de type II

Les topoisomérases de type II introduisent une coupure transitoire double brin au sein d'un duplex d'ADN permettant à un second duplex d'ADN intact de passer au travers du premier duplex. Elles modifient la topologie d'une molécule d'ADN à raison de deux liens topologiques par cycle catalytique mais aussi les entrelacements entre deux molécules d'ADN en les caténant ou les décatenant. Les topoisomérases de type II sont des enzymes multimériques composées de deux sous unités structurales identiques. La structure globale peut être assimilée à une cage à deux portes (Roca and Wang, 1996). Ces topoisomérases suivraient un mécanisme d'action commun (Berger et al., 1996) (Fass et al., 1999).

L'ADN gyrase est composée de deux sous-unités GyrA et deux sous-unités GyrB formant un hétérotétramère. Son action est essentielle chez *E. coli*. La létalité des souches où la gyrase est altérée pourrait être due à une incapacité à initier la réplication ou au blocage de la transcription. C'est la seule enzyme capable d'introduire des supertours négatifs dans l'ADN (Gellert et al., 1976). Elle présente une affinité préférentielle pour l'ADN surenroulé positivement qu'elle relâche en introduisant des supertours négatifs. La sous-unité GyrA porte le domaine de liaison de l'ADN, mais aussi le site de coupure et l'activité de religation. Après fixation du segment n°1 d'ADN à couper, GyrB fixe l'ATP referme le complexe formé avec GyrA pour piéger le segment n°2 d'ADN à transférer. La fixation de l'ADN autour de l'enzyme entraîne la formation d'un supertour positif contraint. Puis, l'enzyme clive le segment n°2 à travers la cassure. Finalement, on observe une religation de la cassure et hydrolyse de l'ATP pour permettre à la protéine de retrouver son état initial.

La topoisomérase IV est composée de deux sous unités codées par les gènes *parC* et *parE*. ParC porte l'activité de liaison à l'ADN, de cassure et de religation. ParE possède l'activité ATPase. Cette enzyme présente une activité de décaténation très efficace, en particulier lorsque les molécules d'ADN sont surenroulées négativement (Hiasa and Mariani, 1996)(Ullsperger and Cozzarelli, 1996). Un site de coupure fort, proche du site *dif*, a été caractérisé (Hojgaard et al., 1999). Elle présente également une activité de relaxation des supertours positifs (Crisona et al., 2000). Lorsque l'ADN gyrase est altérée, des supertours positifs sont accumulés en avant des fourches de réplication. Lors d'une phase de réplication à vitesse ralentie, la présence de la TopoIV peut être suffisante pour gérer l'accumulation des supertours positifs (Khodursky et al., 2000). Il a été démontré que l'activité de la TopoIV est contrôlée au cours du cycle cellulaire par une régulation spatio-temporelle de l'assemblage des deux sous unités ParC et ParE de la TopoIV préférentiellement en fin de réplication (Espeli et al., 2003b) et une activation au moment de la division cellulaire grâce à son interaction avec la protéine du septum de division FtsK (Espeli et al., 2003a). *In vitro*, l'activité de la TopoIV semble être stimulée par des interactions avec les protéines SeqA et MukB (Kang et al., 2003) (Madabhushi and Mariani, 2009).

e. Surenroulement contraint

La condensation de l'ADN est également possible grâce à l'interaction ADN-protéine pour former le surenroulement contraint. L'interaction de ces protéines (les histones) avec l'ADN est la forme principale de compaction des chromosomes chez les eucaryotes. La molécule d'ADN est enroulée autour d'une protéine, cela provoque sa condensation sous une forme toroïdale. La fixation des protéines sur l'ADN provoque deux phénomènes : la formation d'un supertour autour de la protéine et la formation dans le chromosome d'un supertour libre dans le sens inverse du Lk, résolu par les topoisomérases. Ainsi les topoisomérases vont rétablir le niveau de surenroulement libre et éliminer les supertours supplémentaires générés après fixation des protéines.

Plusieurs protéines liant l'ADN pour affecter sa condensation, sont présentes chez *E. coli*. Ces protéines architecturales sont présentes en très grand nombre dans la cellule. Elles influencent la structure du chromosome par interaction spécifique sur des régions particulières mais peuvent également recouvrir de larges zones dépourvues de sites spécifiques (Luijsterburg et al., 2006). Ces protéines sont appelées les NAPs (pour « Nucleoid Associated Proteins »). Il s'agit des protéines H-NS (« Histone-like Nucleoid Structuring protein »), HU

(« Heat Unstable protein »), Fis (Factor for inversion stimulation) ou IHF (Integration Host Factor) (Schneider et al., 2001) (Johnson, R. C. et al., 2005). Ces protéines vont compacter l'ADN en créant par exemple des ponts entre régions distantes comme pour H-NS ou des torsions de l'ADN comme avec HU et IHF. En parallèle de leur fonction architecturale, les protéines NAPs jouent un rôle dans l'expression des gènes dans lesquels se trouve leur site de liaison.

2. Comment les éléments de structuration influencent-ils la ségrégation du chromosome ?

a. Conséquences des altérations de SMC/MukBEF chez les bactéries

Les gènes *muk* ont été identifiés chez *E. coli* lors d'un crible génétique car les mutations causées à ce groupe de gènes produisent des cellules anucléées et des cellules diploïdes (Hiraga et al., 1989). Ils codent les protéines MukB, MukE et MukF. MukB est le premier membre de la famille de protéines SMC découvert chez les bactéries (Niki et al., 1991). Les souches *mukB*- chez *E. coli* mais aussi *smc*- chez *B. subtilis* et *C. crescentus*, ne sont pas capable de former des colonies à 37°C. Elles présentent une augmentation du nombre de cellules anucléées, 100 fois plus que les cellules sauvages, suggérant un défaut de ségrégation (Niki et al., 1991) (Britton et al., 1998) (Niki et al., 1992) (Weitao et al., 2000a) (Graumann et al., 1998) (Moriya et al., 1998). Les mutations *mukE*- et *mukF*- présentent un phénotype similaire aux souches *mukB*- (Yamanaka et al., 1996) et sont requis pour la fonctionnalité de MukB (Yamazoe et al., 1999). MukBEF semble jouer un rôle important dans l'organisation du chromosome dans la cellule. En effet, l'organisation transversale Left-ori-Right est perdue dans les cellules *muk*- (Danilova et al., 2007). De plus, les défauts de ségrégation dans les cellules *muk*- met en évidence les relations entre condensation et ségrégation du chromosome. La ségrégation du chromosome pourrait être facilitée par la compaction de l'ADN nouvellement répliqué à l'origine (Sawitzke and Austin, 2000).

b. Interactions entre topoisomérases et condensines

La TopoIV est une enzyme essentielle à la cellule. Des mutations thermosensibles de la TopoIV provoquent une accumulation de larges nucléoides au centre de la cellule dans des conditions non-permissive (Kato et al., 1988). Ces résultats suggèrent un défaut de

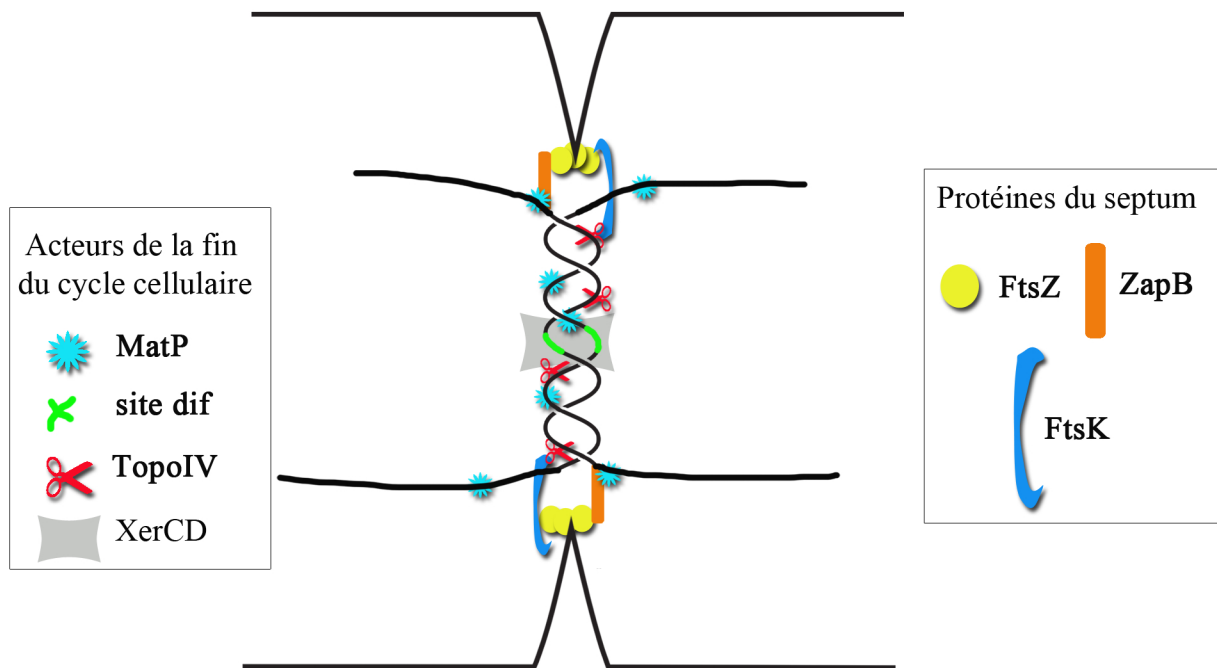


Figure 16 : Modélisation des acteurs de la fin du cycle cellulaire

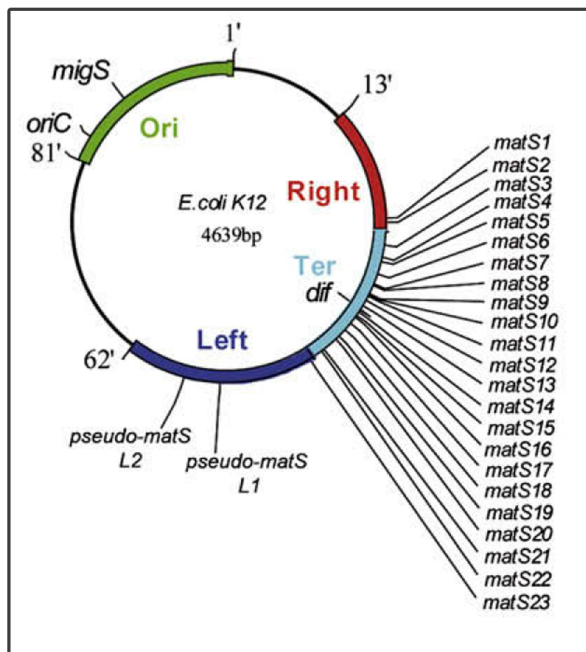
Avant la division cellulaire, les chromosomes répliqués se retrouvent bloquer au septum de division en présence de caténanes. Les protéines du septum peuvent venir interagir avec les acteurs de la fin du cycle cellulaire pour stimuler l'action de ces derniers et permettre la résolution des différents liens topologiques. Ainsi, la protéine MatP interagit avec ZapB et permet le maintien des macrodomaines Ter au septum de division. Les protéines FtsK va transloquer l'ADN pour aligner les sites *dif* l'un en face de l'autre et activer l'activité de recombinaison du système XerCD pour résoudre les dimères de chromosomes. FtsK pourrait également participer à la décaténation des chromosomes en interagissant et en activant la TopoIV. La protéine FtsZ permet toutes ses interactions en mettant en place l'anneau Z, précurseur de l'anneau de division.

ségrégation des chromosomes mais aussi un défaut d'organisation des nucléoides présent alors en amas dans la cellule. Le phénotype *par* issu de mutations des sous unités ParC et ParE est semblable au phénotype cellulaire des mutants *muk*. L'interaction MukB – TopoIV montre une implication fonctionnelle entre les deux protéines (Li et al., 2010) (Hayama and Mariani, 2010) qui pourrait être liée à une application de la prise en charge du chromosome.

Des études ont montré que la TopoIV est capable d'enlever, *in vitro* et *in vivo*, le surenroulement positif généré durant la transcription (Khodursky et al., 2000). Mais elle peut également supporter les modifications topologiques liées à la réplication en absence de l'ADN gyrase, deuxième topoisomérase de type II présente chez *E. coli* (Khodursky et al., 2000). La TopoIV semble avoir un rôle essentiel dans l'organisation du chromosome au cours du cycle cellulaire.

Cependant, en analysant des cellules synchronisées, la TopoIV apparaît comme essentielle en fin de cycle cellulaire (Espeli et al., 2003b). Les cellules déficientes en TopoIV peuvent répliquer normalement leur ADN mais les chromosomes et plasmides répliqués ne peuvent se séparer (Zechiedrich and Cozzarelli, 1995) (Hiasa and Mariani, 1996) (Khodursky et al., 1995). En effet, la TopoIV semble être la décaténase primordiale d'*E. coli* (Adams et al., 1992) (Zechiedrich et al., 1997a) (Zechiedrich and Cozzarelli, 1995) (Khodursky et al., 1995). Les études *in vitro* ont révélé que la TopoIV décatène l'ADN environ 30 fois plus rapidement qu'elle relâche le surenroulement négatif (Ullsperger and Cozzarelli, 1996). De plus, la localisation intracellulaire des deux sous unités de la TopoIV a permis de proposer un modèle de régulation spatio-temporelle de l'activité de la TopoIV (Espeli et al., 2003b). La séparation spatiale des deux sous unités jusqu'à la fin du cycle de réplication permet de contrôler l'activité de décaténation de la TopoIV (Espeli et al., 2003b). La décaténation des chromosomes par la TopoIV s'effectue donc au centre de la cellule et en fin de cycle lors de la mise en place du septum de division (Figure 16) pour éviter une accumulation d'ADN caténés observés chez les mutants thermosensibles (Adams et al., 1992). Une mauvaise décaténation expliquerait la ségrégation aberrante des loci observés dans les cellules dépourvues de TopoIV (Peng and Mariani, 1995). De plus, l'activité de la TopoIV centralisée au centre de la cellule, est augmentée *in vivo* par la protéine septale FtsK (Espeli et al., 2003b).

A



B

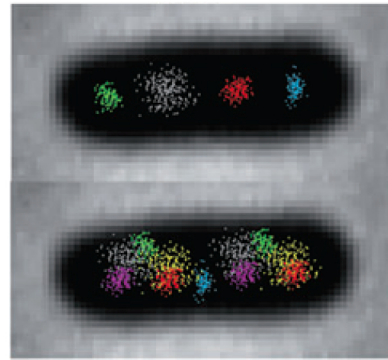


Figure 17 : Organisation du nucléoide en macrodomaine

A. Organisation du chromosome en quatre macrodomaines et deux régions non structurées avec la localisation des 23 sites *matS* dans le macrodomaine Ter.
(Mercier et al 2008)

B. Localisation subcellulaire des macrodomaines Ori (vert) Right (rouge) et Ter (bleu) left (rose) et des deux régions non structurées (gris et jaune) dans une cellule à un chromosome et une cellule à deux chromosomes.

c. Rôles des macrodomaines dans la ségrégation des chromosomes

Le chromosome bactérien présente une organisation supérieure en grandes régions isolées. Par des expériences de localisation subcellulaire de régions du chromosome par « fluorescence *in situ* hybridation » (FISH), le groupe de Niki a pu montrer un comportement du chromosome lié à une organisation autour de deux grandes régions appelées macrodomaines : le macrodomaine Ori (région chromosomique autour de *migS*) et le macrodomaine Ter (région centrée sur *dif*). Les deux régions intermédiaires semblent être une jonction entre les deux macrodomaines (Niki et al., 2000). Des analyses génétiques basées sur les interactions longues distances entre loci du chromosome, développées dans le laboratoire, ont permis de mieux définir les macrodomaines présents sur le chromosome d'*E. coli* (Valens et al., 2004). Quatre macrodomaines ont été ainsi définies comme des régions génétiquement isolées l'une de l'autre : les macrodomaines Ori, Right, Left et Ter (Figure 17A). Dans un même macrodomaine, tous les sites peuvent interagir ensemble mais ne peuvent rencontrer les sites du macrodomaine adjacent. Le macrodomaine Ori est entouré de deux régions définies comme moins structurées appelées NS (pour « Non Structured »). Ces régions contrairement aux macrodomaines peuvent interagir avec l'ensemble du chromosome. De plus, par des outils cytologiques, Olivier Espéli a pu observer la localisation de chaque région chromosomique durant le cycle cellulaire. Chaque macrodomaine occupe un espace bien défini, « réduit » et distinct de l'espace occupé par un autre macrodomaine (Figure 17B). Au contraire, les régions NS possèdent une cage de diffusion spatiale plus large dans la cellule et peuvent être chevauchant avec la cage cellulaire d'un macrodomaine adjacent.

Des études plus approfondies ont permis de mieux comprendre les mécanismes liés à la structuration en macrodomaines du chromosome d'*E. coli*. Le macrodomaine Ter obtient sa structuration de la reconnaissance spécifique d'un site de liaison *matS* par une protéine MatP (Mercier et al., 2008). Les sites *matS* sont présents 23 fois dans le macrodomaine Ter (Figure 17A). En l'absence de la protéine MatP, deux sites du macrodomaine Ter observés par microscopie à fluorescence, perdent leur colocalisation. Le macrodomaine Ter semble plus diffus dans l'espace cellulaire et semble avoir perdu sa structuration de macrodomaine. En absence de MatP ou lorsque des sites *matS* sont délétés les régions sœurs du macrodomaine Ter sont ségréguées plus rapidement après leur réplication.

3. La ségrégation du chromosome est intégrée dans le cycle cellulaire

La ségrégation du chromosome chez *E. coli* est connectée avec plusieurs éléments de contrôle du cycle cellulaire.

a. *SeqA*

La protéine SeqA, qui limite l'initiation de la réplication, est impliquée dans la ségrégation des chromosomes. En effet en absence ou lors d'une surproduction de la protéine SeqA, de nombreuses cellules présentent une ségrégation aberrante des chromosomes (Von Freiesleben et al., 2000) (Bach et al., 2003). La protéine SeqA est regroupée sous forme de foci dans la cellule (Niki and Hiraga, 1998). Le focus est localisé au centre de la cellule au début du cycle cellulaire. Puis le focus se duplique pour migrer aux positions $\frac{1}{4}$ et $\frac{3}{4}$ de la cellule (Niki and Hiraga, 1998) (Hiraga, 2000). Les foci SeqA colocalisent avec les régions nouvellement synthétisées marquées au BrdU (Yamazoe et al., 2005). De plus, il semble que SeqA soit capable de compacter l'ADN nouvellement dupliqué puisque celle-ci peut fixer deux sites GATC distants (Han et al., 2003) et peut former des polymères (Guarné et al., 2005). SeqA favoriserait la ségrégation des chromosomes en compactant progressivement l'ADN nouvellement synthétisé. Une analyse de double mutation *seqA mukB* montre une suppression du phénotype cellulaire et de thermo-sensibilité de la délétion du gène *mukB* (Weitao et al., 1999). Or la suppression du phénotype des mutants *mukB* a été observée en augmentant la superhélicité négative de l'ADN. Les souches *seqA*⁻ présente un excès de superhélicité négative de l'ADN (Weitao et al., 2000b). La protéine SeqA pourrait organiser le chromosome juste après réplication grâce à une contrainte topologique. Les phénotypes des mutants *seqA* pourraient aussi être indirect, en effet, SeqA interagit avec la sous unité ParC de la TopoIV et stimule *in vitro* les activités de la TopoIV (Kang et al., 2003).

b. *SlmA*

La division cellulaire est inhibée par la présence au centre de la cellule du chromosome bactérien (Woldringh et al., 1991). Ce mécanisme est appelé occlusion par le nucléoïde, il implique une inhibition de la formation du septum lorsque les deux chromosomes nouvellement répliqués ne sont pas ségrégés. Les acteurs protéiques de système d'occlusion du nucléoïde ont été identifiés chez *E. coli* et *B. subtilis* : respectivement les

protéines SlmA (Bernhardt and De Boer, 2005) et Noc (Wu and Errington, 2004). Le gène *slmA* a été identifié grâce à sa co-létalité avec le système MinCDE responsable du positionnement de l'anneau septal. Un double mutant *slmA min* forme des cellules filamenteuses qui ne se divisent plus avec la formation aberrante de septum de division sur le nucléoïde alors qu'en absence de Min les septum se forme uniquement dans des régions dépourvues d'ADN (Bernhardt and De Boer, 2005). La protéine SlmA est localisée sur le nucléoïde (Bernhardt and De Boer, 2005), elle reconnaît une trentaine de sites spécifiques répartis sur le chromosome à l'exception du macrodomaine Ter qui en est dépourvu (Cho et al., 2011) (Tonthat et al., 2011). Avant la division cellulaire, la région qui demeure plus longtemps au niveau du centre de la cellule est la région du terminus de réplication (Espeli et al., 2008) (Bates and Kleckner, 2005) (Li et al., 2003). La protéine SlmA semble protéger préférentiellement le chromosome qui se trouve exclu du centre de la cellule de la formation du septum de division. La région terminale qui se localise à proximité septum de division semble donc être protégée par d'autres acteurs pour éviter une division avant ségrégation complète du chromosome.

c. *FtsK*

La formation du septum de division fait appel à une association successive de différentes protéines. FtsZ est mis en place sous forme d'un anneau, l'anneau Z, qui est stabilisé par les protéines ZapA, ZapB, ZipA et FtsA. L'anneau Z permet le recrutement successif des protéines Fts: FtsK, FtsQ, FtsB/FtsL, FtsW, FtsI et FtsN (Goehring et al., 2005). C'est uniquement après formation complète du complexe septal que la constriction cellulaire peut se faire pour permettre la division en deux cellules filles.

La protéine FtsK joue un double rôle : elle participe à la division cellulaire en permettant le recrutement des Fts tardives (Dubarry and Barre, 2010) et elle participe à la ségrégation du chromosome. FtsK est une ADN translocase ancrée au septum *via* son domaine N-terminal (Bigot et al., 2007) (Val et al., 2008). Le domaine C-terminal qui porte l'activité translocase est bien caractérisé. Son rôle principal est l'activation du système de recombinaison *dif*/XerCD lors de la résolution des dimères de chromosome (Aussel et al., 2002) (Figure 16). Cette activité de FtsK implique la translocation sur l'ADN et la lecture de séquences d'ADN orientées et biaisées sur chaque réplichore, les Kops (FtsK Orienting Polar Sequences) (Bigot et al., 2005). La translocation d'ADN *via* FtsK permet d'aligner les sites *dif* portés par chaque chromosome et donc d'activer la recombinaison XerCD. L'activité de

FtsK est strictement couplée au cycle cellulaire, elle ne peut se faire que lors de la constriction du septum de division (Kennedy et al., 2008). FtsK aurait des rôles secondaires moins bien caractérisés au niveau de la ségrégation des chromosomes monomériques. FtsK semble pouvoir sauver l'ADN piégé au septum en absence de *mukB* (Yu et al., 1998) ou lorsque des asymétries artificielles de longueur des réplichores sont créées (Lesterlin et al., 2008). FtsK pourrait également participer à la décaténation des chromosomes frères en activant la TopoIV (Espeli et al., 2003a) ou en catalysant directement une réaction de décaténation par l'intermédiaire de la recombinaison XerCD (Ip et al., 2003).

d. MatP-ZapB

La région du chromosome la plus exposée à la fermeture non contrôlée du septum de division est la région du macrodomaine Ter qui reste pendant une longue période après réplication au centre de la cellule (Espeli et al., 2008). L'absence de la protéine MatP crée un défaut de ségrégation avec une augmentation du nombre de cellules filamenteuses et anucléées en conditions de croissance rapide (Mercier et al., 2008). En croissance lente deux défauts principaux sont observés dans les cellules dépourvues de MatP : i) une décondensation du macrodomaine Ter, qui va donc occuper un volume cellulaire plus grand et être positionné différemment dans la cellule ; ii) une ségrégation précoce des régions terminales sœurs. A ce jour il n'est pas connu si l'un ou l'autre de ces défauts engendre les ségrégations aberrantes observées en croissance rapide. Des études structurales ont pu montrer que la protéine MatP interagit en solution sous forme de tétramère qui pontent deux sites *matS* distants (Dupaigne, P. et al., 2012). Toutefois il ne semble pas que des interactions entre sites *matS* portés par deux chromosomes frères soient possibles. MatP ne serait donc pas une cohésine bactérienne. Pendant ma thèse, l'équipe a pu caractériser une interaction entre MatP et une protéine du septum ZapB (Figure 16). Le maintien des macrodomaines Ter au centre de la cellule par une interaction au septum influence la ségrégation du chromosome. Ainsi en l'absence de MatP, les macrodomaines Ter se ségrégent plus rapidement ayant perdu leur ancrage au septum. J'ai participé à ce travail, il est présenté en annexe de ce manuscrit de thèse. Les résultats qui y sont décrits sont mis en relation avec mon travail principal dans la discussion de ce manuscrit.

V. Le projet de thèse

Dynamique des chromosomes bactériens au cours du cycle cellulaire.

Le cycle cellulaire des bactéries modèles comme *Escherichia coli* et *Bacillus subtilis* présente une phase de colocalisation des chromatides sœurs nouvellement répliquées. Cette étape peut être interprétée comme une cohésion entre chromatides sœurs similaire à celle observée chez les cellules eucaryotes en phase G2. Pourtant les outils utilisés faisant appel le plus souvent à l'utilisation de microscope, ne permettent pas de montrer des interactions directes entre chromatides sœurs. De plus, les mécanismes moléculaires responsables de cette étape sont encore très mal caractérisés. Récemment deux éléments ont été identifiés qui participent à la formation de cette colocalisation. Le groupe de David Sherratt a montré que des liens topologiques, vraisemblablement des précaténanes, pourraient être impliqués dans cette colocalisation (Wang et al., 2008). D'autre part, l'absence de MatP, une protéine identifiée au laboratoire pour son rôle dans l'organisation du macrodomaine Ter (une région de 1Mb, isolée spatialement et génétiquement du reste du chromosome), diminue également considérablement cette étape de colocalisation dans le macrodomaine Ter (Mercier et al., 2008).

Mon projet de thèse s'est orienté autour de plusieurs questions sur la compréhension de la dynamique des chromatides sœurs après réplication. Le premier axe de recherche est basé sur la mise en évidence directe d'une étape de cohésion des chromatides sœurs chez *E. coli*. Le système mis au point au cours de ma thèse est basé sur une recombinaison site spécifique qui permet d'estimer la distance relative séparant les chromatides sœurs. Cet outil nous a permis d'analyser plusieurs loci sur le chromosome d'*Escherichia coli* afin de comprendre les déterminants moléculaires de la cohésion des chromatides sœurs. Nous avons comparé les durées de cohésion estimées par le test de proximité spatiale et les tests de localisation par microscopie. Ainsi nous avons montré que la colocalisation des chromatides sœurs est un processus en deux étapes : une étape précoce impliquant un contact étroit entre chromatides sœurs et une étape tardive où les chromatides sœurs sont séparées physiquement mais maintenues dans un territoire dont la taille est inférieure à la résolution de la microscopie optique conventionnelle (250 nm).

Dans un deuxième temps, nous avons analysé par une approche gène candidat une série de mutants dont l'implication dans la cohésion des chromatides sœurs pouvait être suspectée.

Cette approche nous a permis de révéler le rôle essentiel de l'ADN TopoIV dans la séparation des chromatides sœurs. Ce résultat suggère qu'une portion significative des liens qui unissent les chromatides sœurs sont de nature topologique chez *E. coli*.

Résultats

Les résultats

I. Présentation de l'article : « Sister chromatid interactions in bacteria revealed by a site-specific recombination assay »

1. Résumé de l'article

L'étape de cohésion entre les chromatides sœurs est essentielle dans le cycle cellulaire eucaryote et contrôle plusieurs processus cellulaires comme la ségrégation des chromosomes ou la réparation de l'ADN. La cohésion moléculaire n'a jamais été décrite chez la bactérie *Escherichia coli*. Les études antérieures font l'état d'une étape de colocalisation des régions nouvellement répliquées après observation au microscope à fluorescence. Plusieurs facteurs ont été mis en évidence comme influençant cette étape de colocalisation. Cependant, la cohésion moléculaire n'a pas encore été démontrée. Afin de mettre en évidence cette étape du cycle cellulaire et faire un lien avec les observations de colocalisation par les outils cytologiques, nous avons développé un outil génétique faisant appel à la recombinaison de site spécifique, les sites *loxP*, via la recombinase Cre. Nous avons pu démontrer que les chromatides sœurs existe durant une courte période après la réplication. L'étude de cette étape de cohésion a permis de mettre en avant de nombreuses différences entre la colocalisation et la cohésion moléculaire. En effet, les acteurs de la colocalisation ne semblent pas influencer la cohésion des chromatides sœurs. Par contre, la modulation de l'activité de la Topoisomérase IV révèle son implication dans cette étape de cohésion et que les liens topologiques de l'ADN moduleraient la cohésion.

Sister chromatid interactions in bacteria revealed by a site-specific recombination assay

Christian Lesterlin^{1,2}, Emmanuelle Gigant¹, Frédéric Boccard and Olivier Espéli*

Centre de Génétique Moléculaire du CNRS, Gif-sur-Yvette, France

The process of Sister Chromosome Cohesion (SCC), which holds together sister chromatids upon replication, is essential for chromosome segregation and DNA repair in eukaryotic cells. Although cohesion at the molecular level has never been described in *E. coli*, previous studies have reported that sister sequences remain co-localized for a period after their replication. Here, we have developed a new genetic recombination assay that probes the ability of newly replicated chromosome loci to interact physically. We show that Sister Chromatid Interaction (SCI) occurs exclusively within a limited time frame after replication. Importantly, we could differentiate sister cohesion and co-localization since factors such as MatP and MukB that reduced the co-localization of markers had no effect on molecular cohesion. The frequency of sister chromatid interactions were modulated by the activity of Topo-IV, revealing that DNA topology modulates cohesion at the molecular scale in bacteria.

The EMBO Journal advance online publication, 20 July 2012; doi:10.1038/emboj.2012.194

Subject Categories: cell cycle; genome stability & dynamics
Keywords: chromosome segregation; DNA topology; sister chromatid cohesion; site-specific recombination; Topo-IV

Introduction

In all living cells, the inheritance of genetic material requires the faithful segregation of duplicated chromosomes into daughter cells. In eukaryotic cells, this process involves the alignment of chromatids upon replication, a process called sister chromatid cohesion (SCC) (Nasmyth and Haering, 2009). Newly replicated chromosomes remain tightly aligned and associated until the onset of mitosis. SCC is essential for genome stability since it is required for both high fidelity chromosome segregation and DNA damage repair. Furthermore, SCC is also involved in gene expression and cell development (Nasmyth and Haering, 2009). Cohesion is mediated by cohesin, a specific multi-subunit complex composed of “structural maintenance of chromosomes” (SMC) proteins. Other SMC complexes have a DNA condensing activity (Losada *et al.*, 1998). The

establishment of SCC on newly synthesized DNA is coupled with replication fork progression (Lengronne *et al.*, 2006), and it is thought that cohesin topologically holds sister DNA strands together by trapping the DNA inside a molecular ring (Haering *et al.*, 2002). The dissociation of cohesin complexes precedes a bipolar migration of sister chromosomes during mitosis.

In prokaryotic cells, in contrast to eukaryotic cells, little is known about sister chromosome cohesion and its control. No molecular evidence revealing SCC at the molecular level has been reported, and no proteins with cohesin-like activity have been described. Bacteria contain SMC proteins that have been shown to play a role in chromosome organization and segregation in *E. coli*, *C. crescentus* and *B. subtilis* (Jensen and Shapiro, 1999; Danilova *et al.*, 2007; Cui *et al.*, 2008; Gruber and Errington, 2009; Sullivan *et al.*, 2009). However, experimental evidences indicated a role in condensing-like rather than in cohesin-like activity (Petrushenko *et al.*, 2006). SCC in bacteria has been proposed to occur based on cytological fluorescence imaging that revealed a colocalization period of newly duplicated loci, *i.e.*, the period between the time a locus is replicated and the visual separation of the two sister loci. Depending on the growth conditions, the lifespan of loci colocalization varied (Adachi *et al.*, 2008). Furthermore, sister chromatid co-localization is not constant along the *E. coli* chromosome. It was demonstrated that the region containing the *migS* site (200 kb from *oriC*) was segregated before the *oriC* locus while it is replicated later (Yamaichi and Niki, 2004). In the Ori macrodomain (MD), a large region of about 600 kb adjacent to *oriC* on the right replicore was more cohesive than the distal part of the replicore, the non-structured region (Bates and Kleckner, 2005; Espéli *et al.*, 2008). An abrupt segregation of the region would trigger nucleoid splitting and segregation of the rest of the chromosome (Bates and Kleckner, 2005). Recently, it was shown that two particular regions inside the Ori MD, called snaps, present extensive colocalization as compared to the rest of the MD (Joshi *et al.*, 2011). The Ter MD also displays significant sister co-localization (Espéli *et al.*, 2008). A number of factors (MukB, MatP, Topo-IV) have been shown to modulate the period of sister loci colocalization (Sunako *et al.*, 2001; Mercier *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2008). The effect of Topo-IV inactivation has led authors to propose that catenation might be a major contributor of SCC through colocalization of the sister loci (Wang *et al.*, 2008).

In the present work, we set-up a system that probes the ability of sister chromatids to interact physically, thus revealing sister chromatid cohesion directly in live cells. This new genetic system reports the probability of newly replicated copies of a locus colliding with each other. We used the extensively characterized site-specific recombination system of bacteriophage P1 Cre/*loxP* (Hamilton and Abremski, 1984) combined with a reporter gene to disclose sister chromatid molecular interactions (SCI) along the *E. coli* chromosome.

*Corresponding author. Centre de Génétique Moléculaire du CNRS, Bât. 26, Avenue de la Terrasse, Gif-sur-Yvette 91198, France.

Tel.: +33 1 69 82 32 14; Fax: +33 1 69 82 31 60; E-mail: espeli@cgm.cnrs-gif.fr

¹These authors contributed equally to this work

²Present address: Department of Biochemistry, University of Oxford, Oxford OX1 3QU, UK

Received: 23 December 2011; accepted: 28 June 2012

The assay, called *LacloxP*, revealed that SCI is tightly controlled and lasts for 10–30 min following replication. Beside, the *Laclox* assay was used to test the involvement of several candidates in SCI. We showed that factors that promote co-localization of sister foci do not necessarily increase the ability of sister loci to recombine. Topo-IV was the only factor to display strong variation in sister chromatid interactions (SCI) when altered. The decatenation activity of Topo-IV was required to limit the extent of SCI, suggesting that precatenation links modulates post-replication cohesion between sister chromatids.

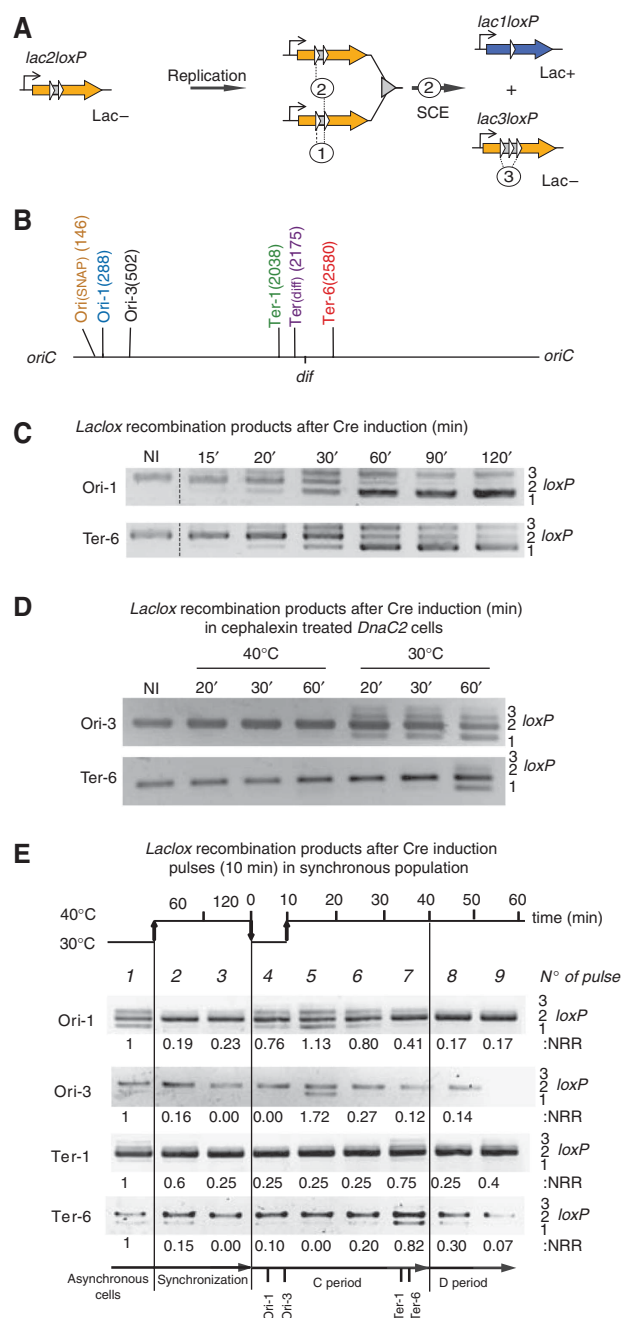
Results

The *LacloxP* assay to probe sister chromatid interactions

We developed a genetic tool to reveal the physical interactions between sister chromatids *in vivo* (Figure 1A). This *LacloxP* assay was based on the Cre/*loxP* site-specific recombination system of the bacteriophage P1. The *loxP* cassettes were designed to detect recombination between sister chromatids. The *lacZ* gene was interrupted by two directly repeated *loxP* sites separated by 21 bp (*lac2loxP* in Figure 1A). β -galactosidase activity was retained in the presence of an in-frame fusion of a single *loxP* in *lacZ* (*lac1loxP*).

Figure 1 The *LacloxP* assay revealed sister chromatid interactions. (A) The *LacloxP* construct consisted of the *lacZ* gene (orange arrow) under a constitutive promoter that was interrupted by two directly repeated *loxP* sites (white arrows). This construct conferred the Lac⁻ phenotype. The intramolecular recombination event (noted 1) was prevented by the proximity between the two *loxP* sites. After replication, intermolecular recombination occurred between sister chromatids (noted 2) when Cre was produced. This recombination forms the *lac1loxP* product (blue arrow), conferring the Lac⁺ phenotype. The intramolecular recombination between the first and third *loxP* sites of *lac3loxP* product is noted event 3. (B) Map of the *E. coli* chromosome with the position of the six loci tested in this study labeled. The positions are indicated in kb from the *oriC*. (C) Recombination events were revealed using PCR amplification that detected the substrate, *lac2loxP* (406 bp), and products, *lac1loxP* (351 bp) and *lac3loxP* (460 bp). The gel shows PCR amplification obtained on total DNA sample extracted from MG1655 strains containing the *LacloxP* system at the Ori-1 or Ter-6 loci before (NI) and after Cre induction for the indicated time. (D) *LacloxP* recombination happens on replicating chromosomes but not fully segregated chromosomes. Recombination events were revealed using PCR amplification following Cre induction in the MG1655*dnaC2* strain. Replication initiation was blocked by a 2-h shift to a non-permissive temperature (40°C) simultaneously cytokinesis was prohibited by the addition of cephalixin (10 μ g/ml). In these conditions the cells filamented and accumulated segregated nucleoids (data not shown). Cre induction was performed at 40°C for 20, 30 or 60 min, or following replication initiation after a downshift from 40 to 30°C for 20, 30 and 60 min. (E) *LacloxP* recombination follows the replication forks. We used the *dnaC2* thermosensitive allele to synchronize the population. Cells were grown at 30°C until OD 0.2 and were shifted to 40°C for two hours to allow the completion of ongoing replications. Replication was initiated by a 10 min shift at 30°C, and cells were returned to 40°C to avoid over-initiation. Nine pulses of 10 min Cre induction were performed and then the cells were immediately harvested and frozen in liquid nitrogen. Genomic DNA was extracted and used for PCR amplification, revealing the formation of *LacloxP* recombination products. The quantification of recombination is presented (NRR), it corresponds to the measure of the amount of *lac1loxP* plus *lac3loxP* compared to the amount of *lac2loxP*. The values were normalized to that observed for the asynchronous culture.

The recombination of two *loxP* sites carried by the same molecule, i.e., an intramolecular/intrachromatid event (event 1 Figure 1A), was prevented by the proximity of the two *loxP* sites. The minimal distance required between two *loxP* sites for them to recombine was reported to be 82 bp; no recombination was detected *in vitro* below this distance (Hoess and Abremski, 1985). Thus, the reconstitution of an active *lacZ* gene that conferred the Lac⁺ phenotype (*lac1loxP*) was predicted to require recombination between the replicated sister *LacloxP* cassettes, i.e., an intermolecular/interchromatid event (event 2, Figure 1A). We introduced the *LacloxP* recombination cassette in six different chromosome loci: three close to the *oriC* (Ori-1, Ori-3 and Ori_(SNAP)), three in the *terminus* region (Ter-1, Ter_(dif) and Ter-6) (Figure 1B). To control recombination, the Cre recombinase gene was carried by a pSC101 plasmid and was under the control of



the P_{BAD} promoter. Induction of *cre* was achieved by the addition of 0.1% L-arabinose in order to ensure the homogeneous induction of the P_{BAD} promoter in the population.

Recombination events between sister chromatid are rapidly detected by a PCR assay

The formation of recombinant products, *lac1loxP* and *lac3loxP*, was detected by PCR assay (Figure 1C). The *lac1loxP* and *lac3loxP* products were detected 15 min after Cre induction and accumulated to high levels after 30 and 60 min, respectively; most of the *lac2loxP* substrate was converted into *lac1loxP* and *lac3loxP* products. After 120 min, the reciprocal recombination product *lac3loxP* was hardly detected, indicating that it was converted into the *lac1loxP* product. In *lac3loxP*, the external *loxP* core sequences were separated by 105 bp and therefore supported intramolecular recombination *in vivo* (event 3, Figure 1A). Because of event 3 on the *lac3loxP* substrate, the amount of SC in the *lac1loxP* configuration can nearly reach 100% upon a long *cre* induction.

We first tested if *lac2loxP* recombination could occur between fully segregated chromosomes. We used an *E. coli* strain where replication initiation was under the control of a *dnaC2*, a thermosensitive allele of the DnaC initiation protein. At a non-permissive temperature (40°C), replication initiation was blocked, but ongoing rounds of replication were completed (Withers and Bernander, 1998). In the presence of cephalixin, which inhibits cytokinesis, the cells grew into filaments that harbored 4–8 fully replicated and segregated nucleoids. In these conditions, the induction of the Cre recombinase (for 20–60 min) did not result in the formation of any of the recombinant product (Figure 1D). This showed that, according to predictions, recombination did not occur between the directly repeated *loxP* sites that were spaced 21 bp apart on the same chromosome. Furthermore, recombination did not occur between fully segregated chromosomes. In contrast, when the temperature was shifted to 30°C concomitantly with *cre* induction, recombination products were observed after 20 min for the Ori-3 locus and after 60 min for the Ter-1 locus, consistent with their relative position on the replicohores. This suggested that *lac2loxP* recombination was strictly dependant on replication of the locus.

Sister chromatid cohesion during a limited time window after their replication

We designed an experiment to determine the period of the replication cycle that is permissive for SCI (Figure 1E). To do so, we synchronized the cells using a thermosensitive allele of DnaC (*dnaC2*) that blocks initiation of replication at non-permissive temperature (40°C). The synchronization was achieved through three successive temperature shifts: (i) a 30–40°C shift for 2 h to terminate the ongoing round of replication; (ii) a 40–30°C shift for 6 min to initiate replication; (iii) a 30–40°C shift to inhibit further initiation of chromosome replication. We used flow cytometry to control the synchrony and measure the replication rate at 40°C (Supplementary Figure S1A); replication appeared to be completed in about than 40–50 min and half of the population had achieved cell division after 70 min (Supplementary Figure S1B). Assuming a linear progression of the forks, we approximated the times of replication of the Ori-1, Ori-3,

Ter-1 and Ter-6 loci to be 5, 8, 35 and 36 min after initiation of replication, respectively. The expression of *cre* was induced by 10 min pulses: one at 30°C before synchronization, two during the period of synchronization at 40°C (after 60 and 120 min), one during the temperature downshift at 30°C that triggered the initiation of replication, and finally five more during the subsequent incubation at 40°C. Cells were immediately frozen in liquid nitrogen after each pulse and genomic DNA was extracted. PCR amplification was performed to reveal the formation of *lac1loxP* recombination products (Figure 1E). Recombination was observed for every locus in the asynchronous cultures (pulse number 1). The amount of recombinant product *lac1loxP* in the asynchronous culture was used as a reference and normalized to 1 for the quantification of the recombination in the synchronized cells. The recombinant products were not detected after the inhibition of replication initiation at 40°C (pulses no 2 and no 3 in Figure 1E). Recombinant products were detected at early time points (10 and 20 min) following the synchronous replication initiation at the Ori-1 locus (no 4 and no 5 in Figure 1E) and were still detectable 30 and 40 min after replication initiation (no 6 and no 7). For the Ori-3 locus, recombinant products were detected 20 min after initiation of replication (pulse no 5) and were hardly visible 30 min after replication initiation (pulse No 6). For the Ter-1 and Ter-6 loci, recombinant products were detected 40 and 50 minutes after replication initiation. These results indicated that recombination between sister chromatids can occur immediately after replication and only for a limited period of time, about 30 min for Ori-1 and 10–20 min for Ori-3, Ter-1 and Ter-6. Note that the amount of *lac1loxP* product detected by PCR was relatively low. This result suggested either that only a small fraction of the sister chromatids was maintained in a sufficient proximity to allow recombination or that the level of recombinant product was underestimated, perhaps because part of the long-lived Cre/*loxP* synapse intermediate was not a suitable template for PCR amplification (see below).

Lac+ colonies formation is an accurate measure of SCI

While the direct detection of recombinant products was enlightening the temporal control of SCI, because of the strong constraints imposed by the synchronization procedure, this approach was not appropriate to quantify SCI and analyze parameters that may modulate SCC. We used the same intermolecular recombination assay described above but the frequency of recombination (forming *lac1loxP* product) was measured according to the amount of Lac+ colonies observed on X-Gal plates (Figure 2). To assess the level of SSC in different regions of the chromosome, we performed the recombination assay with *lac2loxP* cassettes inserted at six different positions (Ori-1, Ori-3, Ori_{snap}, Ter-1, Ter-6 and Ter_{diff}). Differential abilities of chromosome regions to promote *LacloxP* recombination could reflect either differential abilities for sister chromatids to interact or the difficulty for Cre to form synapsis between *loxP* sites in some regions of the chromosome. To discriminate between these two possibilities, we also measured for the same loci the capacity of intramolecular *loxP*/Cre recombination to estimate the relative access of Cre to different chromosomal regions (Figure 2A). The intramolecular recombination cassette contains two directly repeated *loxP* sites spaced by the rifampicin resistance gene: the 1 kb intervening segment separating the

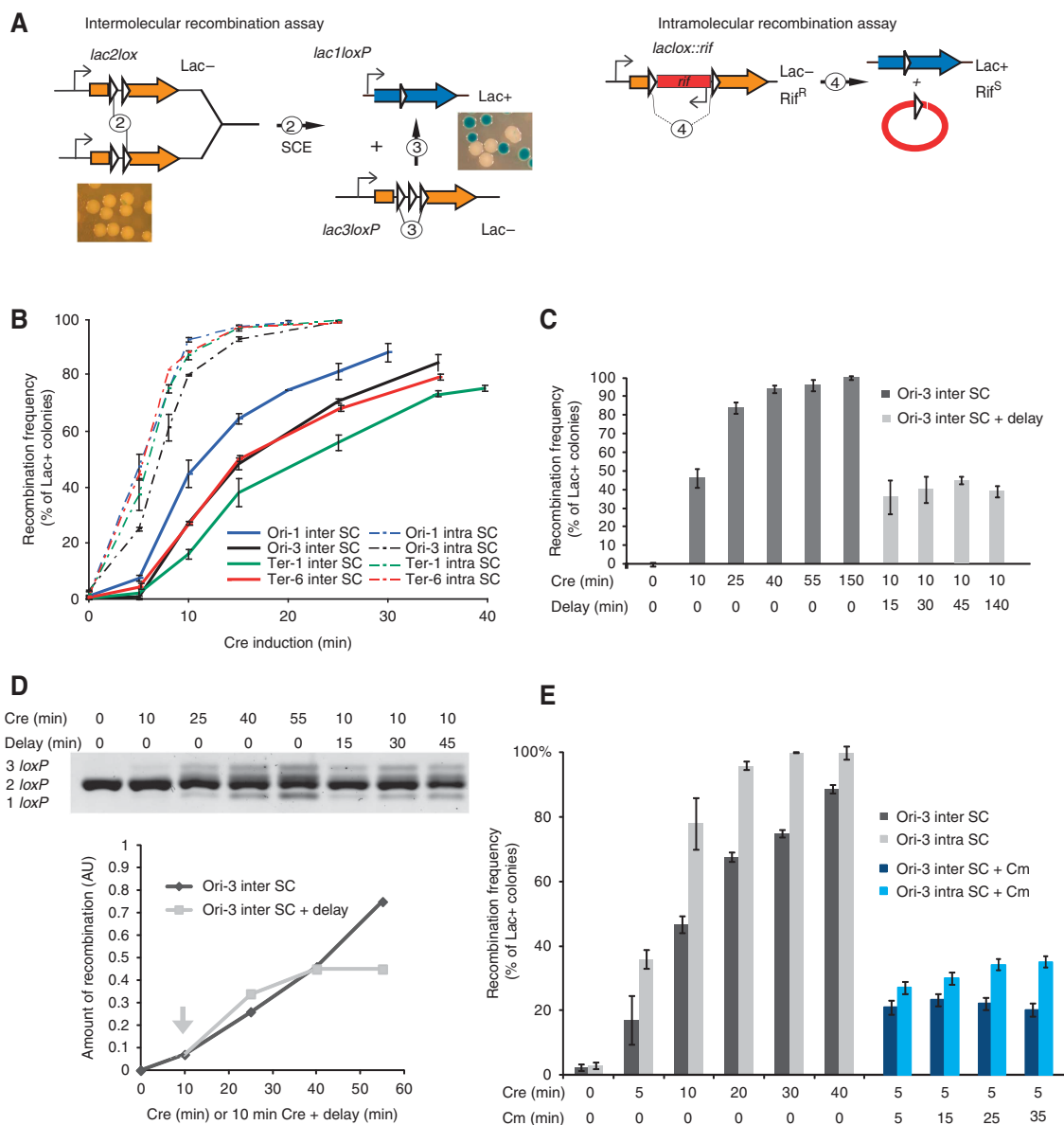


Figure 2 *Lac+* colonies formation is an accurate measure of SCE. (A) Description of the inter and intramolecular recombinations. The intermolecular reaction, as described on Figure 1A, involves sister chromatid exchange between *loxP* sites (SCE). The intramolecular recombination between *loxP* sites distant from 1 kb can be monitored at every loci tested by the deletion of a *Rif* cassette and the reconstitution of the *lacZ* gene. It is used to control Cre accessibility at the different loci tested and the influence of the genetic background on Cre reactivity. Both inter and intramolecular recombination frequencies can be measured on plate by the formation of blue colonies. (B) Measurement of the frequency of SCE (inter-SC) and intramolecular recombination (intra-SC) according to the extent of Cre induction. The curves represent the average of four experiments. (C) Measure of the frequency of SCE by *Lac+* colonies counting at the Ori-3 locus (inter SC). Following Cre inductions for 10–150 min after induction the cells were diluted 10^4 fold and immediately plated (dark gray). After the 10 min induction, cells were diluted 10^4 fold and kept in liquid culture with shaking for a delay up to 140 min before plating (light gray). (D) PCR analysis of the recombination products observed for the Ori-3 locus in the same induction conditions than on Figure 2C. Genomic DNA was extracted immediately after induction or after the indicated dilution delay. The amount of recombined products (3 *loxP* + 1 *loxP*) was measured by density scanning with a Typhoon after electrophoresis (AU arbitrary densitometry unit). The arrow indicates the timing of the dilution. (E) Measure of the ability of Cre to produce recombined colonies following translation inhibition by the addition of chloramphenicol (Cm). The recombination frequency at the Ori-3 inter SC and Ori-3 intra SC cassette was measured by *Lac+* colonies counting in the absence of Cm (gray boxes) or in the presence of Cm (120 μ g/ml) 5 min after the addition of arabinose (blue boxes), the cultures were incubated at 30°C for the indicated times, then diluted 10^4 fold and immediately plated.

two *loxP* sites ensured efficient synapse formation in *cis* (Figure 2A). We recorded the number of recombinants as a function of Cre induction time for the six loci carrying cassettes for the intermolecular or the intramolecular assay (Figure 2B and Supplementary Figure S2C). The curves for the intramolecular recombination followed simple enzymatic rules: a short lag is observed (<1 min), then a robust and

linear recombination rate is observed for every locus (~10–13%/min). After 10 min of induction, a plateau is reached at approximately 100%. The curves for the intermolecular recombination differed slightly. We observed a longer lag (~3 min) followed by a linear recombination rate (~3–7%/min). A plateau (70–80% of *Lac+* colonies) is reached after 25–40 min of induction (Figure 2B).

In order to quantitatively relate the level of recombination to the molecular cohesion, we tested if the rate of recombination of the Ori-3 locus was dependent on the time left after induction and before plating. Following *cre* induction, cultures were diluted to stop the induction, and either immediately plated or kept at 30°C for 15–140 min before plating (Figure 2C). When the cultures were immediately diluted and plated, the frequency of Lac⁺ colonies observed on plate raised quickly to 100%. Strikingly, increasing the delays before plating did not change the frequency of Lac⁺ colonies. Similar results were observed with the Ori-1 and Ter-1 loci (Supplementary Figure S2A). These observations suggest that most of the recombination took place during the induction pulse. The amount of recombined DNA was also directly monitored by PCR analysis (Figure 2D) or Southern blot (Supplementary Figure S2B); they revealed that recombined Ori-3 products were not efficiently detected immediately after the recombination pulse, they accumulated during the dilution step to reach a plateau (~40% for a 10 min pulse, i.e. a similar amount than Lac⁺ colonies). These experiments indicated that recombination intermediates formed at the end of the induction period were converted into recombinant products during the 30 min that followed *cre* induction. These observations imply a rapid inactivation of the Cre recombinase following dilution of the arabinose inductor. We confirmed that the formation of Lac⁺ colonies did not rise after induction by using chloramphenicol to block translation at the end of the induction pulse (Figure 2E). The intramolecular recombination cassette was used at the Ori-3 position to measure recombination in the presence of chloramphenicol (for 5–35 min after induction). As observed for the dilution experiments, the amount of Lac⁺ colonies did not increase after inhibition of translation. These experiments indicated that the amount of Cre able to perform new recombination on SC formed in the minutes following the induction pulse is very limited. Therefore the number of recombinant resulted from the number of *loxP* synapses that formed during the induction time or shortly after; discrepancies between the PCR and the plating assays likely originated from a slow resolution of the synapse into recombination products. The amount of recombinant colonies on plate is likely the best quantification of the number of cells presenting molecular cohesion for the defined locus in the population for a given time interval, i.e. sister chromatids involved in molecular cohesion.

LacloxP recombination reveals variability in sister chromatid cohesion along the chromosome

Considering that intramolecular recombination is possible at any step of the *E. coli* cell cycle, we postulated that the intermolecular recombination rate relates to the fraction of the cell cycle when SC are available for recombination, i.e. the cohesion period. After the initial lag, both intermolecular and intramolecular reaction were following a single exponential decay (Amount of Lac⁻ colonies) = Ae^{-kt} . A is a constant that is close to 150% for the intermolecular reaction and close to 300% for the intramolecular reaction, t is the length of the induction period and k is catalytic constant of each reaction (sec^{-1}) (Figure 3A and Supplementary Figure S2D). For the intramolecular reaction, k varies from 2 to $6.5 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ suggesting that Cre recombination is not equivalent in every region of the chromosome. These values are in the same

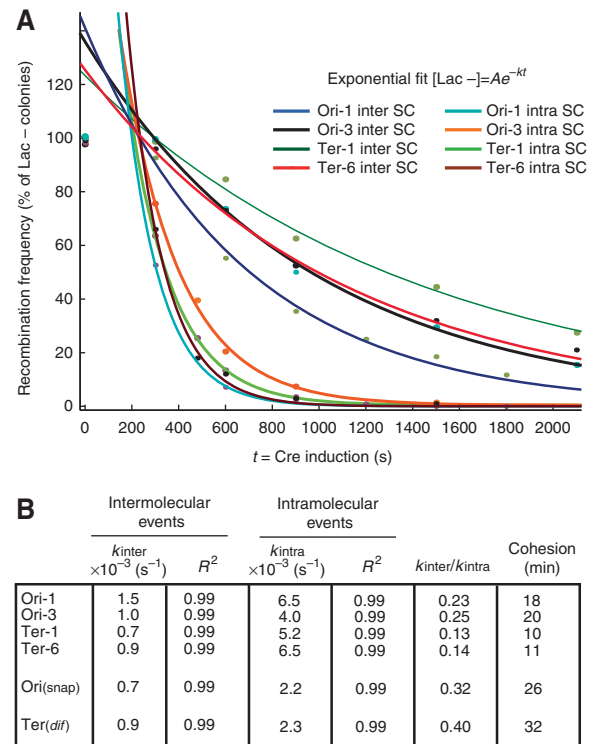


Figure 3 Sister chromatid interaction varied according to the locus considered. (A) Cre recombination follows single exponential decay kinetics for the inter and the intramolecular recombination reactions. The data from Figure 2B were plotted according to the disappearing of Lac⁻ colonies versus the length of the induction. Single exponential fits are represented. To avoid taking into consideration the lag observed during the first 5 min, the fits exclude the time 0 and 2.5 min of induction. (B) Kinetic constants, k_{inter} and k_{intra} were presented for every reaction. The estimation of the Cohesion Period was given by $CP = \tau \times (k_{\text{inter}}/k_{\text{intra}})$, where τ is the generation time (80 min).

range as that measured *in vitro* (3–7 min per event) confirming that Cre recombination is not a fast reaction (Fan, 2012). For the intermolecular reaction, k varies from 0.7 to $1.5 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ (Figure 3B). Considering that when the SC are in close contact the inter and intramolecular reactions are equally efficient, the ratio $k_{\text{inter}}/k_{\text{intra}}$ gives an estimation of the portion of the cell cycle allowing inter SC recombination. We estimated that SC were in contact for 18 min (23% of the 80 min cell cycle) at the Ori-1 locus, 20 min at the Ori-3 (25% of 80 min) locus, 10 min (13% of 80 min) at the Ter-1 locus and 11 min (14% of 80 min) at the Ter-6 locus (Figure 3B). Since intramolecular recombination efficiency were comparable for the Ori and Ter loci, it was unlikely that the difference in the estimated cohesion would be caused by the higher level of recombination resulting from a higher copy number of the Ori loci compared to the Ter loci. We measured the kinetic parameter of SCI for two other loci known for an extended colocalization of newly replicated sister chromatid, in the snap region (Ori_{snap}) (Joshi *et al*, 2011) and near the dif site (Ter_{dif}) (Espeli *et al*, 2008). SC at the Ori_{snap} and Ter_{dif} loci, respectively, support intermolecular recombination for 32% of the cell cycle (26 min) and 40% of the cell cycle (32 min) (Figure 3B, Supplementary Figure S2B and C). SCI was high for the snap and dif regions; it suggested that the *LacloxP* assay and the colocalization of FROS tags were able

to catch similar constraints on the SC. These observations suggested that the frequency of *LacloxP* recombination is an accurate tool to monitor SC proximity.

Distinction of SCI and colocalization of loci

Sister loci colocalization has been extensively used as an indirect measure of the cohesion period in both eukaryotic (Straight *et al*, 1996) and bacterial cells (Sunako *et al*, 2001; Bates and Kleckner, 2005; Espeli *et al*, 2008). In bacteria, the FROS systems, the *parS*/ParB-GFP systems and the FISH technique have been used to monitor SC colocalization. However, these approaches remain unsatisfactory and controversial because colocalization varies according to the growth rate (Adachi *et al*, 2008), it does not necessarily imply that sister loci can interact physically and it relies on a difficult determination of the cell cycle parameters, C and D periods, in bacteria, (Nielsen *et al*, 2007; Adachi *et al*, 2008; Espeli *et al*, 2008; Lesterlin *et al*, 2008). The quantification of the number of SSB-Ypet foci and their repartition according to the cell size is a precise way to define the C and D period (Reyes-Lamothe *et al*, 2008; Espeli *et al*, 2012). The characterization of the cell cycle parameters according to the SSB-Ypet pattern (Figure 4A and B) is presented on Figure 4C. New-born cells were finishing the replication rounds initiated in the mother cell; they presented two SSB-Ypet foci corresponding to the forks that replicated the right and left replichores. Later, the two foci merged at mid-cell for the replication of the terminus region. After a period without replication (cells lacking SSB-Ypet focus), the replication was initiated simultaneously on two chromosomes (large cells with two SSB-Ypet foci). A few minutes before division, the replication forks separated, giving rise to cells with 4 SSB-Ypet foci. The amount of cells without SSB-Ypet foci (30%) allows the direct estimation of the replication period C (56 min; ~70% of 80 min), The amount of large cells with 2 and 4 foci (22%) allows the determination of the timing of initiation (22 min before division) and therefore of the time between termination and cell division, the D period (46 min).

We compared the extent of molecular cohesion observed with the *LacloxP* assay (Figure 3) and the extent of sister loci colocalization observed by the *parS*/ParB-GFP FROS (Figures 4C and D). We used the cell cycle parameters to calculate the timing of replication and the extent of the colocalization period for each locus (Figure 4E). We estimated that sister Ori-1, Ori-3, Ter-1 and Ter_{diff} loci were colocalized for 37, 22, 31 and 45 min, respectively, following their replication and cohesive at the molecular level for 18, 20, 10 and 32 min, respectively (Figure 3B). For most of the tested loci, the estimated period of colocalization was longer to that of molecular cohesion (Figure 4C). The *LacloxP* assay only picks up a fraction of the colocalized SC; this suggests that colocalized SC correspond at least to two states: one where SC are close enough to recombine frequently, i.e., the SCC step, and one where the sister *loxP* are not able to recombine. In order to get more insight into the relationship between SCI and colocalization, we measured SCI in genetic backgrounds that have been previously reported to modulate the duration of chromosome loci colocalization.

MatP influenced loci colocalization but not molecular cohesion

MatP, the structuring factor of Ter MD is required for the colocalization of the replicated Ter MDs to hold them together

in close spatial proximity before bipolar segregation (Mercier *et al*, 2008). It is therefore possible to use *matP* mutant cells to investigate the interdependence between the level of SCI and the colocalization lifespan of the structured Ter MD. The *matP* deletion specifically altered colocalization (50% reduction) of the sister foci in the Ter MD under growth conditions used for the recombination assays (Figures 4D and E). Ter-1 and Ter_{diff} loci, colocalization was observed for 31 and 45 min in wt cells and only for 13 and 24 min in the absence of MatP. In the *matP* mutant, the level of SCI was only slightly decreased compared to the wild type: a 14, 18 and 23% decrease, respectively, for the Ter-1 Ter-6 and Ter_{diff} loci (Figure 4F and Supplementary Figure S3). This result shows that most of the SCI was retained in a context where colocalization was profoundly altered. Therefore, MatP-mediated colocalization does not enhance the interactions between sister Ter loci, indicating that SCI is established by another factor or mechanism. Strikingly, in the Ter domain, the remaining colocalization observed in the absence of MatP is close to the extent of molecular cohesion determined with the *LacloxP* assay, it suggests that, in the Ter MD, sister chromatid colocalization is the consequence of two event: (i) a SCI step independent on MatP; (ii) a SC colocalization step dependent on MatP. These results showed that colocalization revealed by fluorescence imaging should not be associated to SCC since the duration of spatial proximity between sister loci does not reveal their ability to interact physically.

Topo-IV activity modulated sister chromatid cohesion and colocalization

Topo-IV is an important player in sister loci segregation (Wang *et al*, 2008) and we investigated the effect of modulating Topo-IV activity on the level of SCI. We tested the effect of transient inactivation of Topo-IV on the frequency of *LacloxP* cassettes inserted at four different positions were measured in wt and *parC1215^{ts}* (Topo-IV^{TS}) strains. The wt and Topo-IV^{TS} strains exhibited the same frequency of intramolecular recombination under permissive and after a 20 min shift to non-permissive temperatures Supplementary Figure S4A). By contrast, intermolecular recombination was enhanced for all loci at permissive and non-permissive temperatures (Figure 5A). We also tested the effect of Topo-IV overproduction using a plasmid that encoded ParE and ParC, the two subunits of the Topo-IV. Unfortunately, upon IPTG induction, Topo-IV overexpression had detrimental consequences on cell physiology (Mosesso *et al*, 2000) and perturb greatly both inter and intra molecular recombination (data not shown); it limited the quantitative analysis, however intermolecular recombination was still detectable at high level in these conditions. In the absence of IPTG, conditions where a leak of the inducible promoter produced a small increase of Topo-IV amount, we observed a small reduction of SCI for the Ori-3 and Ter-1 respectively, 0.72 ± 0.05 and 0.76 ± 0.04 of the SCI observed with the empty vector.

Using a *parS*/parB^{P1}-GFP system at the Ori-3 locus, we observed that under the conditions of the *LacloxP* assay, Topo-IV alteration affected sister chromatid segregation (Figure 5B). Twenty minutes after Topo-IV inactivation, the number of cells with only one Ori-3 locus increased two-fold

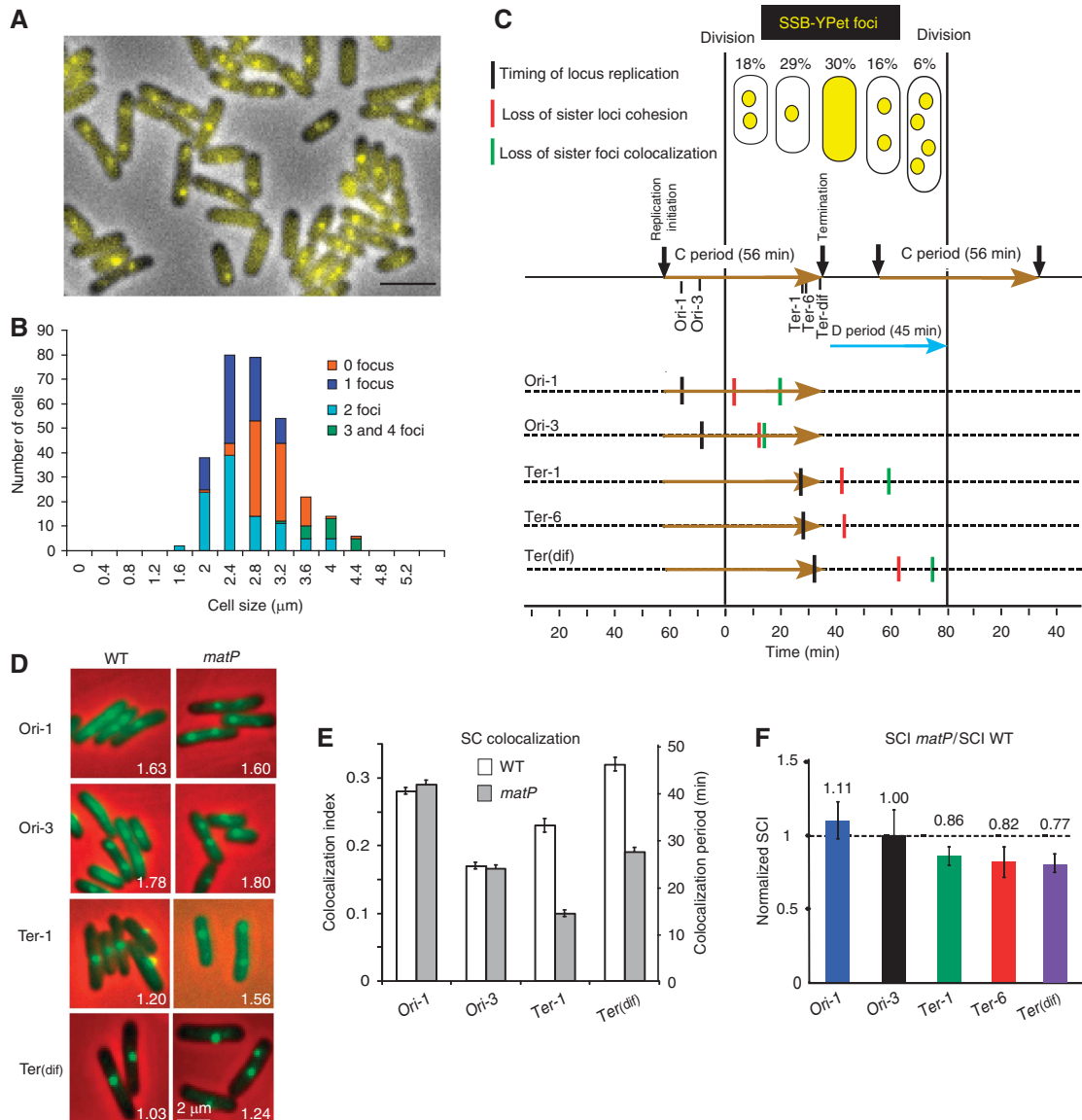


Figure 4 Sister chromatid colocalization and SCI are not equivalent measures of sister chromatid cohesion. **(A)** The SSB-Ypet fusion was used to monitor replication parameters. A representative picture of the MG1655-SSB-YPet strain grown in Minimal Medium A + casamino acids + glycerol. **(B)** histogram of the amount of cells present in each cell size category according to the number of SSB-YPet foci observed in the cells. **(C)** Representation of the cell cycle in the MG1655 strain grown in Minimal Medium A + casamino acids + glycerol at 30°C. The percentage of cells in the population according to the number of SSB-Ypet foci is indicated. The cells with two foci were split into two categories: the small cells represent a size below the median size of the cells with 1 focus, and the large cells represent a size above the median size of the cells with 1 focus. The generation time (τ) is 80 min, the C period is 56 min (brown arrows) and the D period is 45 min (cyan arrow). The timing of replication (black vertical bars), the estimated timing of the loss of SC cohesion (red vertical bars) and the estimated timing of the loss of SC colocalization (green vertical bars) are indicated for each locus. **(D)** Representative pictures of the *parS*/ParBP1-GFP tag inserted at the Ori-1, Ori-3 Ter-1 and Ter_{dif} locus. The MG1655 and MG1655*matP* cells were grown in minimal medium A supplemented with casamino acids and glycerol (Green *parS*/ParBP1-GFP, Red Phase contrast microscopy). For each strain the average number of foci per cell is indicated. **(E)** Measure of the colocalization of the sister *parS*/ParBP1GFP foci. The cell cycle parameters (generation time, length of the C period and D period) measured in Figure 4A–C were used to estimate the average number of copies of each locus in the cells ($N_{b_{loc}}$). The average number of foci per cell (N_{foc}) was measured from (Figure 4D). The left axis represents the colocalization index, defined as $(N_{b_{loc}} - N_{foc})/N_{b_{loc}}$. The right axis represents the estimated lifespan of SC colocalization. **(F)** Measure of SCI with the *LacIoxP* system for the Ori-1, Ori-3, Ter-1, Ter_{dif} and Ter-6 loci in the MG1655*matP* strain. The relative normalized recombination frequency is defined as $(\text{Inter SC } matP / \text{Intra SC } matP) / (\text{Inter SC wt} / \text{Intra SC wt})$.

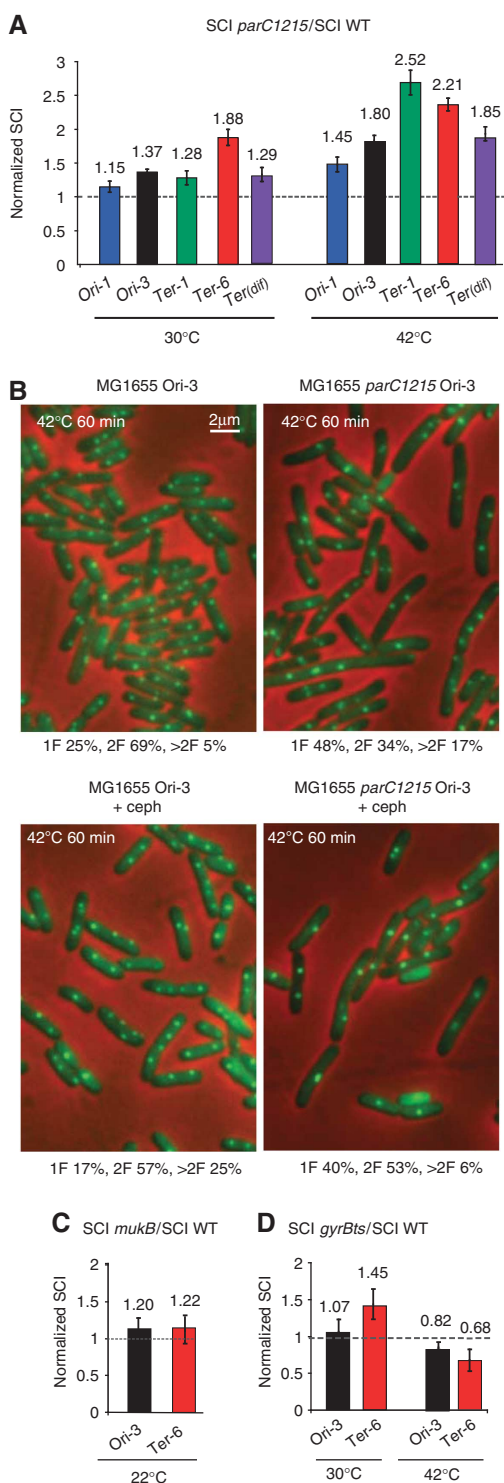
compared to the wt cells. Due to the concomitant increase in the number of cells with more than 2 foci, the average number of foci per cell remained constant at 1.83 and 1.84 in the WT and Topo-IV^{TS} strains, respectively. Since the average number of foci is the value taken into account in the original estimation of colocalization, this result suggested that SC colocalization might not be changed by Topo-IV

inactivation. However, we observed a delay in cell division in the Topo-IV^{TS} strain at 42°C that could be the reason for the increased number of cells with more than two foci. We added cephalixin to block division in both strains. In the presence of cephalixin, the number of cells with only one focus increased and the average number of foci decreased in the Topo-IV^{TS} strain (2.31 in the WT and 1.7 in the Topo-IV^{TS}).

Therefore, the segregation of sister Ori-3 loci was severely impaired in the absence of active Topo-IV. We performed the same experiment with a *parS*/*parB*^{P1}-GFP tag inserted at the Ter-1 locus, SC segregation was also impaired in the absence of Topo-IV (2.1 in the WT and 1.7 the Topo-IV^{ts}) (Supplementary Figure S4B).

Regulation of DNA topology around the replication fork controls SCI

The strong influence of Topo-IV transient inactivation on intermolecular recombination and sister foci segregation



suggested that destabilizing the topological equilibrium toward the accumulation of positive supercoils and/or precatenanes could trigger a prolonged cohesion period, within which the sister chromatids were prone to interact. It has been shown recently that the ability of Topo-IV to remove positive supercoils, but not its activity on catenanes, was enhanced by an interaction with the SMC MukB protein (Hayama and Mariani, 2010). In addition, MukB has been proposed to enhance the colocalization period of sister loci near the *oriC* (Sunako *et al*, 2001). We deleted *mukB* from the cells, which is only tolerated at low temperature (22°C), and performed the recombination assay. A slight increase in the intermolecular recombination rates was observed in the absence of MukB (Figure 5C and Supplementary Figure S5). This showed that the MukBEF complex in *E. coli* was not directly responsible for the establishment of the cohesion of the Ori-3 and Ter-6 loci. This result is consistent with the fact that the alteration of the decatenating activity of Topo-IV, rather than the positive supercoil removal, was involved in the modulation of recombination between sister chromatids. These results, presented in Figure 5, suggested that precatenanes enhanced sister-chromatid cohesion.

Topological management of the positive supercoils generated by the replication fork was controlled by the activity of the DNA gyrase and eventually Topo-IV downstream of the fork. On plasmid DNA, the excess positive supercoils were transferred to the replicated region and took the form of precatenanes (Peter *et al*, 1998). Precatenanes have not yet been directly observed on chromosomes. It has been proposed that precatenanes can form in response to an excess of positive supercoils that DNA gyrase could not remove (Postow *et al*, 2001). Therefore, we tested if alteration of the gyrase activity in the *gyrB203*^{ts} allele led to an increase in the intermolecular recombination rate. The *gyrB203*^{ts} allele produce a nearly wt gyrase at permissive temperature (30°C) and a completely deficient enzyme at non permissive temperature (42°C). Compared to the wt strain at a permissive temperature, we observed 7 and 45% increases for the Ori-3 and Ter-6 loci, respectively, in intermolecular recombination, in the strain containing the *gyrB203*^{ts} allele (Figure 5D and Supplementary Figure S5). After a 20 min shift to a non-permissive temperature (42°C), a significant decrease in the intermolecular rate was observed (Figure 4D).

Figure 5 Topoisomerase-IV (Topo-IV) controls the extent of SCI. **(A)** The measure of SCI using the *LacloxP* system for the Ori-1, Ori-3, Ter-1, Ter-6 and *Ter_{dif}* loci in the MG1655*parC1215* strain at a permissive temperature of 30°C, followed by a 20 min shift to a non-permissive temperature at 42°C. The relative normalized recombination frequency was defined as (Inter SC *parC1215*/Intra SC *parC1215*)/(Inter SC wt/Intra SC wt). **(B)** The inactivation of Topo-IV provokes a reduction in the number of MG1655*parC1215* cells segregating the sister Ori-3 *parS*/*ParBP1* foci. A representative picture of the Ori-3 *parS*/*ParBP1*-GFP tag in the MG1655 and MG1655*parC1215* cells after a 20 min shift at 42°C in the absence or presence of cephalosporin to inhibit cell division. The percentage of cells with 1 focus (1F), 2 foci (2F) or more than 2 foci (>2F) are indicated. **(C)** The measure of SCI using the *LacloxP* system for the Ori-3 and Ter-6 loci in the MG1655*mukB* strain at 22°C. Relative normalized recombination was defined as (Inter SC *mukB*/Intra SC *mukB*)/(Inter SC wt/Intra SC wt). **(D)** The measure of SCI using the *LacloxP* system for the Ori-3 and Ter-6 loci in the MG1655*gyrBts* strain after a 60 min shift at 42°C. The relative normalized recombination was defined as (Inter SC *gyrBts*/Intra SC *gyrBts*)/(Inter SC wt/Intra SC wt).

We propose that a slight decrease in the DNA gyrase activity at a permissive temperature was sufficient to increase precatenation without impeding replication (Grompone *et al*, 2003). At a non-permissive temperature, excess positive supercoils ahead of the fork trigger rapid replication fork blockage, and ongoing decatenation by Topo-IV reduces the sister chromatid interaction frequencies.

Discussion

Sister chromatid cohesion at the molecular level in *E. coli*

Here, we report the construction of a new molecular probe that quantitatively revealed the level of sister chromatid physical interactions (SCI) in live cells. The reconstitution of the *lacZ* reporter involved intermolecular recombination between newly replicated sister *loxP* sites. Strikingly, recombination was dramatically higher between SC of replicating chromosomes compared to fully segregated chromosomes (Figure 1C), suggesting that a particular structure is linking the two SC. The ability to recombine *loxP* sites suggests that portions of sister chromatids are kept aligned for several minutes. These characteristics made the *LacloxP* genetic assay a valuable and appropriate tool to investigate the interaction ability of the newly replicated sister loci and reveal their close proximity. The rate of Lac⁺ colonies after *cre* induction appears to be a reliable and accurate

method to quantify the relative molecular cohesion at a defined locus.

The lifespan of chromosome cohesion has been previously inferred from sister loci colocalization studies (Sunako *et al*, 2001; Bates and Kleckner, 2005; Espeli *et al*, 2008). This indirect approach based on fluorescent microscopy was intrinsically controversial since sister loci colocalisation does not necessarily implicate or reflects their ability to cohere at the molecular scale. Furthermore, no consensus view emerged as these studies led to different estimates of the colocalisation periods. Our study provided evidence that the level of colocalization is not always reflected in the level of sister chromatid cohesion. Sister loci were consistently involved in a cohesion step following their replication. SCI were detected at all loci tested between 10 and 32 min. These cohesion estimates are always shorter than the extent of sister chromatid colocalization under the same conditions (Figure 4C), suggesting that part of the colocalization period is not giving rise to sister loci interactions (Figure 6). For instance, the early stages of sister loci separation would still exhibit colocalisation without being able to interact at the molecular scale (see yellow zone in Figure 6). Indeed, the alteration of sister colocalization in Ter MD, following the deletion of *matP*, did not correlate with a comparable reduction of SCI. Therefore, as revealed in the *matP* strain, colocalization involved mechanisms that were superimposed to the cohesion itself. Remarkably, loci in the snap regions

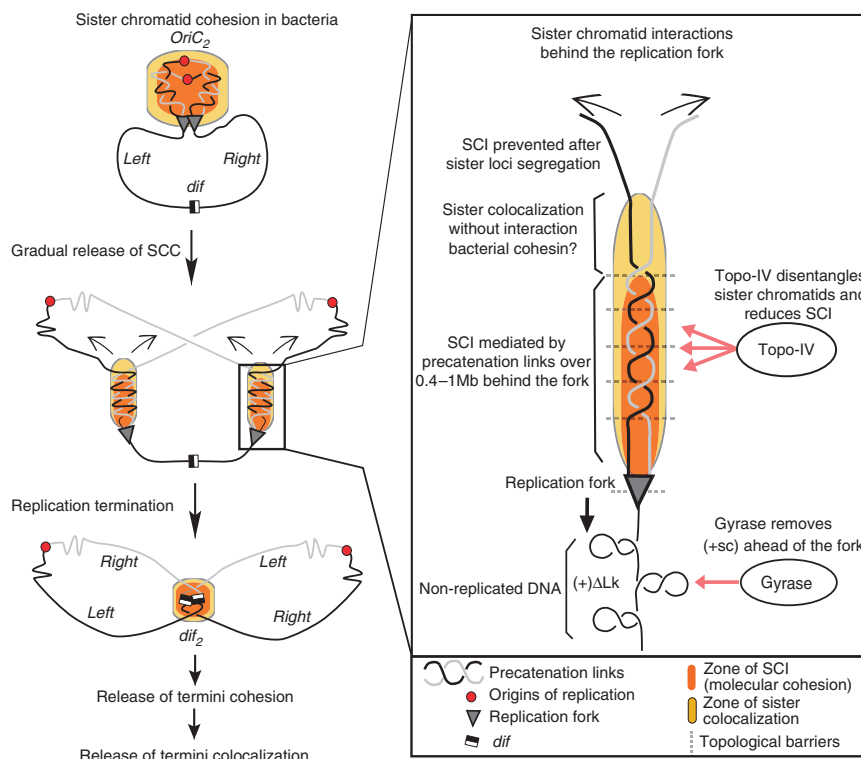


Figure 6 Model for establishment and release of sister chromatid cohesion in *E. coli*. In *E. coli* (middle panel) SSC is gradually released behind the replication fork in such a way that segregation of sister loci begins before replication terminates. On the present model, SCC is mediated by pre-catenation links that promote sister chromatids interactions (SCI, orange areas) and colocalisation (yellow zone). Interestingly, colocalisation does not necessarily confer the ability to interact physically. For Topo-IV, the main decatenase in *E. coli*, is proposed to release SSC by removing pre-catenation links created by replication. Concomitantly, DNA gyrase acts before the replication fork to relax positive supercoils (+sc). SCC is then established immediately after replication, and released after a time frame required for resolution of topological links. Topological barriers or chromosome segregation are able to limit the diffusion of precatenation. The persistence of SCI for a 10–30 min period after replication suggests that a region about 400 kb to 1MB is involved in cohesive precatenation.

and near the *dif* site that presented long colocalization periods also presented a strong SSC suggesting that the two events could be correlated. Further studies using the *LacloxP* assay would allow performing a quantitative analysis of the SCI extent at the genome scale. Furthermore, this genetic assay can theoretically be adapted to a variety of organisms and be used to measure the ability of two homologous or heterologous DNA pieces to interact physically in live cells.

Roles for sister chromatid cohesion in bacteria

As observed in eukaryotes, SCI in *E. coli* is established during S phase. This process has functional implications. First, it should ensure the availability of the sister chromatid to repair newly synthesized damaged DNA duplexes near the replication fork (Cox *et al*, 2000). We observed a long SCI period for the *dif* proximal locus in the *terminus* of replication. In our study, this locus is the only one that would still present SCI for a long time after the end of S phase (Figure 6). The prolonged SCI at the *dif* locus could favor chromosome dimers resolution by the XerCD/*dif* system (Deghorain *et al*, 2012). SC cohesion in eukaryotes plays another important role by securing chromosome segregation. The processes controlling chromosome segregation in bacteria are not fully understood. A number of segregation machineries have been shown to interact with the Ori region (for review see (Possoz *et al*, 2012)). However, the involvement of active mechanisms to promote the segregation of the chromosome bulk is not known. In this regard, SCC may help to control the timing of sister chromatids separation in the two cell halves.

Topo-IV modulated sister-chromatid cohesion

We showed that transient inactivation of Topo-IV dramatically increased the level of SCI in three of the four loci tested. Topo-IV was the main *E. coli* enzyme involved in removing catenanes links between two circular DNA molecules (Zechiedrich *et al*, 1997). This indicated that the entanglement of replicated sister sequences facilitated their interaction, likely by delaying their segregation (Figure 6). The work presented on Figure 5 allows estimating that the absence of Topo-IV increases sister chromatids cohesion by two fold. It is consistent with the observation that Topo-IV activity modulated the lifespan of sister sequence colocalization around the chromosome in *E. coli* (Figure 4) and (Wang *et al*, 2008) and *C. crescentus* (Wang and Shapiro, 2004). Based on these observations, the pairing of sister chromatids could result from the formation of precatenanes. The superhelical tension accumulated in the front of the fork as positive supercoils would be converted into precatenanes behind the fork, upon free rotation of the replication fork (Postow *et al*, 2001). We propose that precatenanes formed behind the replication fork enhance sister chromatid cohesion (see pink zone on Figure 6). The reduction of SCI observed upon mild overexpression of Topo-IV suggests that in wt cells precatenanes form some of the cohesion links between sister chromatids. We cannot rule out the hypothesis that cohesion is established through a different mechanism (a yet uncharacterized cohesin like activity) and that precatenation would reinforce this mechanism. Such interplay between cohesins and DNA tangles has been recently observed during SCC in yeast (Farcas *et al*, 2012). Precatenanes have been observed *in vivo* on replicating plasmids (Peter *et al*, 1998;

Schwartzman *et al*, 2011), but have not been directly observed on chromosomes. Peter and colleagues demonstrated that the positive supercoils ((+) Δ Lk) generated by plasmid replication diffuses throughout a topological domain so that it is distributed both ahead, (+) Δ Lk, and behind the replication fork, precatenanes (Peter *et al*, 1998). Therefore, topological barriers that limit the diffusion of precatenanes are required to explain the different extent of SCI observed for the different loci tested. For example the high transcription rate of ribosomal DNA could serve as topological barriers and concentrate the precatenation links around the *snaps* regions near the origin (Joshi *et al*, 2011). Alternatively, the segregation of the chromosome *per se* could force the precatenanes to accumulate in the regions in contact with the replication forks (Figure 6). Various speed or tension imposed by the segregation of an upstream region would therefore modulate the extent of cohesion of the downstream regions.

Modulation of precatenation during the cell cycle

The partition of the work between DNA gyrase and Topo-IV during replication remains unclear. It is assumed that the gyrase is in charge of the (+) Δ Lk ahead of the replication fork. In the absence of gyrase, Topo-IV provides sufficient (+) Δ Lk unwinding to support replication of a small part of the chromosome at one-third of the wt rate (Khodursky *et al*, 2000). In the absence of Topo-IV, replication proceeds until the end of the chromosome at the wt rate (Wang *et al*, 2008). Topo-IV activity appeared to reach its peak after the S phase (Espeli *et al*, 2003). Therefore, Topo-IV is predicted to play a limited role in the dissipation of the (+) Δ Lk waves ahead of the replication forks. Our system allowed for the estimation of the extent of the cohesion step, from 10 to 30 min, following replication. At the estimated replication rate of 42 kb/min/fork, the replication forks move 400 kb away from any replicated loci within 10 min, suggesting that sister chromatids are linked over 400–800 kb behind the replication fork. This result raised a question about the regulation of Topo-IV activity. Is the Topo-IV amount limiting compared to the introduction of precatenanes links? We estimate that Topo-IV activity, \sim 3000 Lk/s/cell (Espeli *et al*, 2003) is in large excess compared to the precatenane formation rate, \sim 50 Lk/s/fork (Peter *et al*, 1998). It is likely that a control of Topo-IV activity is required to maintain a sufficient level of precatenation to support sister chromatid cohesion. This regulation could rely on the differential subcellular localization of ParE and ParC subunits, as observed in *E. coli* (Espeli *et al*, 2003) and *C. crescentus* (Wang and Shapiro, 2004).

Materials and methods

General procedures and constructs

The wild type strain was *E. coli* K12 MG1655 (Δ *lacMluI*). The *LacloxP* cassette was constructed by the integration of a double stranded oligonucleotide 5'-CGTAATAACTTCGTATAATGTATGCTATA CGAAGTTATGGATCCCCGGGTACCGAGCTCATAAAGTTTCGTATAATGT ATGCTATACGAAGTTATCCTA-3' into the *Clal* restriction site of the *lacZ* gene. The *LacloxP* cassette was integrated in the chromosome, using a vector derived from pKD4 called pGBKD3-*Laclox* and pGBKD3-*Lacloxrif*. These vectors contained the *LacloxP* or the *Lacloxrif* cassettes adjacent to the chloramphenicol resistance gene. *Laclox::Cm* and the *parS::Cm* were inserted into the intergenic regions of non-essential genes (Espeli *et al*, 2008) using the

standard 'lambda red' technique (Datsenko and Wanner, 2000). Expression of the Cre recombinase was driven by a pSC101 carrying the arabinose-inducible Cre gene derived from pFX465, kindly given by FX Barre. The $\Delta 30\text{ParB}$ -GFP fusion protein was expressed from plasmid pALA2705. The *mukB::Kn*, *DnaC2::Tet*, *parC1215^{TS}::Tet*, *gyrB203^{ts}::Tet*, *matP::Cm* and *ssb-yet::Cm* strains were constructed using standard techniques.

Cre induction assay

Bacterial strains containing the *LacloxP* insertions of interest were grown in appropriate medium and temperature to OD₆₀₀ = 0.2. The production of Cre was induced by adding 0.1% arabinose, and induction was stopped by a 10⁴ fold dilution with fresh culture medium or by freezing the cells in liquid nitrogen. Cell samples were immediately plated on X-gal containing plates to measure the ratio (Lac+ / total colonies). All experiments were performed in minimal medium A supplemented with 0.2% glycerol and 0.12% casamino acids, except for the synchronization experiment with the *dnaC2* strain where glycerol was substituted with 0.2% succinate. Kanamycin (50 µg/ml), streptomycin (100 µg/ml), tetracycline (15 µg/ml) and chloramphenicol (30 µg/ml) were added when required. PCR was performed with the ExTaq (TaKaRa) Taq DNA polymerase, on genomic DNA extracted from liquid nitrogen frozen cells using the Macherey Nagel genomic extraction kit.

Cell cycle features and microscopy

The cell cycle features were experimentally characterized using generation time, SSB-YPet foci pattern and rifampicin/cephalexin flow cytometry (Mercier *et al*, 2008). The following equation from Helmstetter gives the average number of loci/genes per cell in the population (Helmstetter, 1996): average number of loci = $2^{[C(1-x)+D]/\tau}$ where x is the fraction of the C period at which the

locus replicates, and τ is the generation time. Therefore, the number of generation from locus replication to division, $R = \ln(\text{average number of loci})/\ln(2)$. Similarly, the number of generations from focus separation to cell division, $S = \ln(\text{average number of foci})/\ln(2)$ (Nielsen *et al*, 2007). The colocalization periods (CP) is given by $CP = (R - S) \times \tau$. Cells carrying a *parS* insertion and plasmid pALA2705 were grown to OD₆₀₀ = 0.2, concentrated 50-fold by centrifugation and placed on an agarose pad on a slide. Microscopy analysis was performed as described before (Espeli *et al*, 2008). For each experiment, 200–400 cells were counted.

Supplementary data

Supplementary data are available at *The EMBO Journal* Online (<http://www.embojournal.org>).

Acknowledgements

We want to thank Michele Valens for her great experimental assistance, François Xavier Barre for the gift of plasmid pFX465, Hsiu-Fang Fan and Ludovic le Chat for critical reading of the manuscript. The work performed in FB lab was funded by the program ANR 08-Blan-0119 2009–2012. The work performed in OE lab was funded by the program ANR JCJC 2010-2014 SISTERS.

Author contributions: CL, EG, OE performed the experiments; CL, EG, FB, and OE designed the experiments; CL, EG, FB and OE wrote the manuscript.

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

References

- Adachi S, Fukushima T, Hiraga S (2008) Dynamic events of sister chromosomes in the cell cycle of *Escherichia coli*. *Genes Cells* **13**: 181–197
- 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
- Cox MM, Goodman MF, Kreuzer KN, Sherratt DJ, Sandler SJ, Marians KJ (2000) The importance of repairing stalled replication forks. *Nature* **404**: 37–41
- Cui Y, Petrusenko ZM, Rybenkov VV (2008) MukB acts as a macromolecular clamp in DNA condensation. *Nat Struct Mol Biol* **15**: 411–418
- Danilova O, Reyes-Lamothe R, Pinskaya M, Sherratt D & Possoz C (2007) MukB colocalizes with the *oriC* region and is required for organization of the two *Escherichia coli* chromosome arms into separate cell halves. *Mol Microbiol* **65**: 1485–1492
- 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**: 6640–6645
- Deghorain M, Pages C, Meile JC, Stouf M, Capioux H, Mercier R, Lesterlin C, Hallet B, Cornet F (2012) A defined terminal region of the *E. coli* chromosome shows late segregation and high FtsK activity. *PLoS One* **6**: e22164
- Espeli O, Borne R, Dupaigne P, Thiel A, Gigant E, Mercier R, Boccard F (2012) A MatP-divisome interaction coordinates chromosome segregation with cell division in *E. coli*. *EMBO J* **31**: 3198–3211
- Espeli O, Levine C, Hassing H, Marians KJ (2003) Temporal regulation of topoisomerase IV activity in *E. coli*. *Mol Cell* **11**: 189–201
- Espeli O, Mercier R, Boccard F (2008) DNA dynamics vary according to macrodomain topography in the *E. coli* chromosome. *Mol Microbiol* **68**: 1418–1427
- Fan HF (2012) Real-time single-molecule tethered particle motion experiments reveal the kinetics and mechanisms of Cre-mediated site-specific recombination. *Nucleic Acids Res* (advance online publication, 29 March 2012; doi:10.1093/nar/gks274)
- Farcas AM, Uluocak P, Helmhart W, Nasmyth K (2012) Cohesin's concatenation of sister DNAs maintains their intertwining. *Mol Cell* **44**: 97–107
- Grompone G, Ehrlich SD, Michel B (2003) Replication restart in *gyrB* *Escherichia coli* mutants. *Mol Microbiol* **48**: 845–854
- Gruber S, Errington J (2009) Recruitment of condensin to replication origin regions by ParB/SpoOJ promotes chromosome segregation in *B. subtilis*. *Cell* **137**: 685–696
- Haering CH, Lowe J, Hochwagen A, Nasmyth K (2002) Molecular architecture of SMC proteins and the yeast cohesin complex. *Mol Cell* **9**: 773–788
- Hamilton DL, Abremski K (1984) Site-specific recombination by the bacteriophage P1 *lox*-Cre system. Cre-mediated synapsis of two *lox* sites. *J Mol Biol* **178**: 481–486
- Hayama R, Marians KJ (2010) Physical and functional interaction between the condensin MukB and the decatenase topoisomerase IV in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA* **107**: 18826–18831
- Helmstetter CE (1996) *Timing of Synthetic Activities in the Cell Cycle* Vol. 2, Washington, DC: ASM Press
- Hoess RH, Abremski K (1985) Mechanism of strand cleavage and exchange in the Cre-*lox* site-specific recombination system. *J Mol Biol* **181**: 351–362
- Jensen RB, Shapiro L (1999) The *Caulobacter crescentus* *smc* gene is required for cell cycle progression and chromosome segregation. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**: 10661–10666
- Joshi MC, Bourniquel A, Fisher J, Ho BT, Magnan D, Kleckner N, Bates D (2011) *Escherichia coli* sister chromosome separation includes an abrupt global transition with concomitant release of late-splitting intersister snaps. *Proc Natl Acad Sci USA* **108**: 2765–2770
- Khodursky AB, Peter BJ, Schmid MB, DeRisi J, Botstein D, Brown PO, Cozzarelli NR (2000) Analysis of topoisomerase function in bacterial replication fork movement: use of DNA microarrays. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**: 9419–9424
- Lengronne A, McIntyre J, Katou Y, Kanoh Y, Hopfner KP, Shirahige K, Uhlmann F (2006) Establishment of sister chromatid cohesion at the *S. cerevisiae* replication fork. *Mol Cell* **23**: 787–799
- Lesterlin C, Pages C, Dubarry N, Dasgupta S, Cornet F (2008) Asymmetry of chromosome Replichoes renders the DNA

- translocase activity of FtsK essential for cell division and cell shape maintenance in *Escherichia coli*. *PLoS Genet* **4**: e1000288
- Losada A, Hirano M, Hirano T (1998) Identification of *Xenopus* SMC protein complexes required for sister chromatid cohesion. *Genes Dev* **12**: 1986–1997
- Mercier R, Petit MA, Schbath S, Robin S, El Karoui M, Boccard F, Espeli O (2008) The MatP/matS site-specific system organizes the terminus region of the *E. coli* chromosome into a macrodomain. *Cell* **135**: 475–485
- Mossessova E, Levine C, Peng H, Nurse P, Bahng S, Mariani KJ (2000) Mutational analysis of *Escherichia coli* topoisomerase IV. I. Selection of dominant-negative parE alleles. *J Biol Chem* **275**: 4099–4103
- Nasmyth K, Haering CH (2009) Cohesin: its roles and mechanisms. *Annu Rev Genet* **43**: 525–558
- Nielsen HJ, Youngren B, Hansen FG, Austin S (2007) Dynamics of *Escherichia coli* chromosome segregation during multifork replication. *J Bacteriol* **189**: 8660–8666
- Peter BJ, Ullsperger C, Hiasa H, Mariani KJ, Cozzarelli NR (1998) The structure of supercoiled intermediates in DNA replication. *Cell* **94**: 819–827
- Petrushenko ZM, Lai CH, Rai R, Rybenkov VV (2006) DNA reshaping by MukB. Right-handed knotting, left-handed supercoiling. *J Biol Chem* **281**: 4606–4615
- Possoz C, Junier I, Espeli O (2012) Bacterial chromosome segregation. *Front Biosci* **17**: 1020–1034
- Postow L, Crisone NJ, Peter BJ, Hardy CD, Cozzarelli NR (2001) Topological challenges to DNA replication: conformations at the fork. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**: 8219–8226
- Reyes-Lamothe R, Possoz C, Danilova O, Sherratt DJ (2008) Independent positioning and action of *Escherichia coli* replisomes in live cells. *Cell* **133**: 90–102
- Schvartzman JB, Martinez-Robles ML, Hernandez P, Krimer DB (2011) Plasmid DNA replication and topology as visualized by two-dimensional agarose gel electrophoresis. *Plasmid* **63**: 1–10
- Straight AF, Belmont AS, Robinett CC, Murray AW (1996) GFP tagging of budding yeast chromosomes reveals that protein-protein interactions can mediate sister chromatid cohesion. *Curr Biol* **6**: 1599–1608
- Sullivan NL, Marquis KA, Rudner DZ (2009) Recruitment of SMC by ParB-parS organizes the origin region and promotes efficient chromosome segregation. *Cell* **137**: 697–707
- Sunako Y, Onogi T, Hiraga S (2001) Sister chromosome cohesion of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **42**: 1233–1241
- Wang SC, Shapiro L (2004) The topoisomerase IV ParC subunit colocalizes with the *Caulobacter* replisome and is required for polar localization of replication origins. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**: 9251–9256
- Wang X, Reyes-Lamothe R, Sherratt DJ (2008) Modulation of *Escherichia coli* sister chromosome cohesion by topoisomerase IV. *Genes Dev* **22**: 2426–2433
- Withers HL, Bernander R (1998) Characterization of dnaC2 and dnaC28 mutants by flow cytometry. *J Bacteriol* **180**: 1624–1631
- Yamaichi Y, Niki H (2004) migS, a cis-acting site that affects bipolar positioning of oriC on the *Escherichia coli* chromosome. *EMBO J* **23**: 221–233
- Zechiedrich EL, Khodursky AB, Cozzarelli NR (1997) Topoisomerase IV, not gyrase, decatenates products of site-specific recombination in *Escherichia coli*. *Genes Dev* **11**: 2580–2592

II. Résultats complémentaires de l'article : « Sister chromatid interactions in bacteria revealed by a site-specific recombination assay »

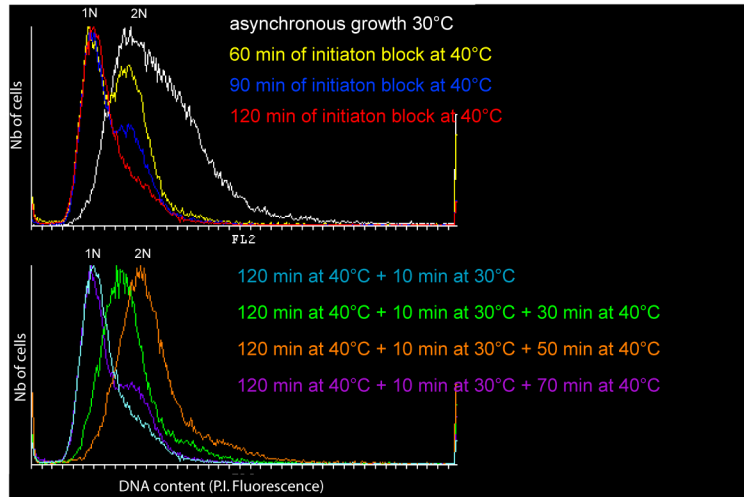


Figure S1

Figure S1. Flow cytometry analysis of the cell cycle synchronization

Cells were grown under slow growth conditions (minimal medium A, casamino acids, 0.2% succinate), where *E. coli* undergoes a eukaryote-like cell cycle consisting of a G1 like-phase (called B period), followed by the S like-phase of replication (C period) and finally the post-replication G2 like-phase (D period). Flow cytometry analysis of the MG1655*dnaC2* strain containing the *Laclox* tool at the Ori-3 locus during the cell cycle synchronization process. The flow cytometry was performed on aliquots harvested and fixed before each Cre induction pulse. The DNA content was followed by propidium iodide fluorescence.

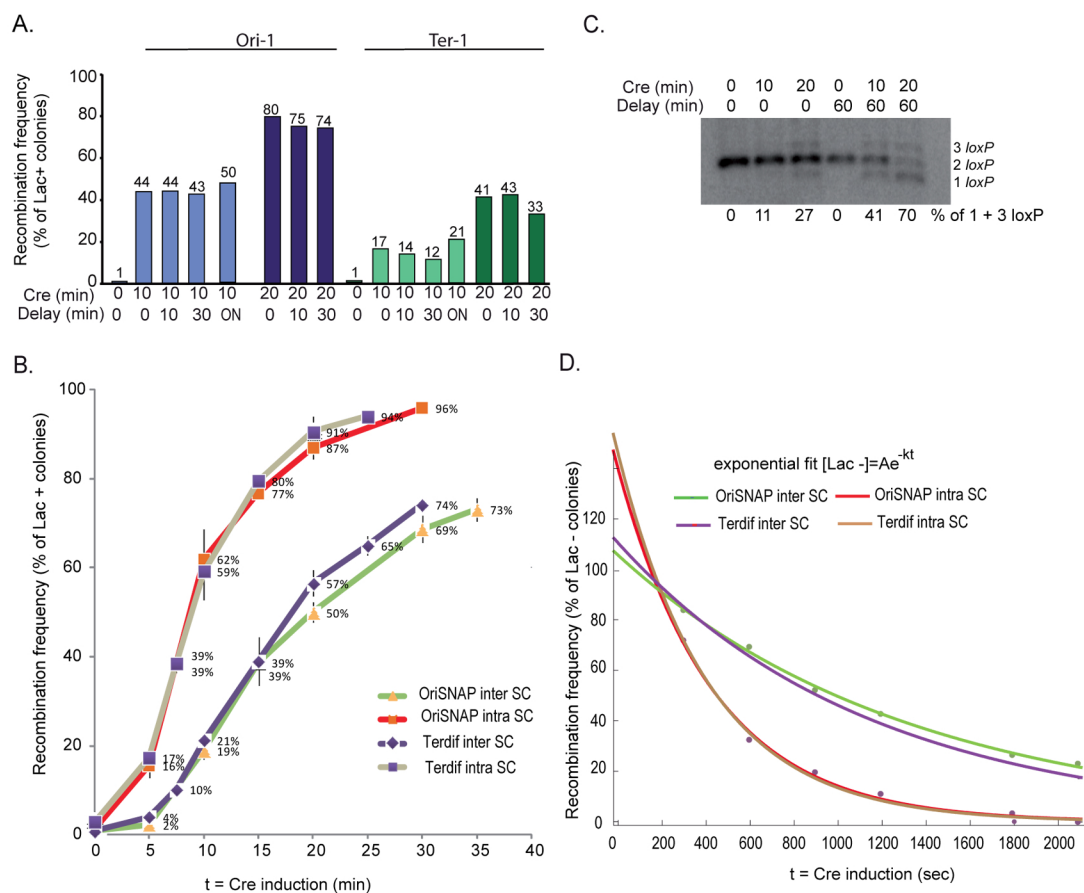


Figure S2. SCI can be quantified according to the frequency of Lac⁺ colonies formed on X-gal plates.

A) Measure of the frequency of Lac⁺ colonies for the Ori-3 locus with the intramolecular cassette (intra SC). Histograms present the frequencies of *Laclox* recombination obtained following a 5 or 10 min Cre induction. After the induction, colonies were diluted in LB and kept in liquid culture with shaking for indicated delay time before plating **B)** Measure of the frequency of SCI by Lac⁺ colonies counting (inter SC). Histograms present the frequencies of *Laclox* recombination obtained for two *Laclox* insertions at Ori-1 and Ter-1 loci following a 10 or 20 min Cre induction. After the induction, colonies were diluted in LB and kept in liquid culture with shaking for indicated delay time before plating before plating (ON, overnight). **C)** Southern blot analysis of the recombination products observed for the Ori-3 locus in the same induction conditions than on Figure 2C. Genomic DNA was extracted immediately after induction or after a 60 min of dilution. The amount of recombined products (% of 1 + 3 *loxP*) was quantified with a Typhoon scanner. **D)** Cre recombination follows single exponential decay kinetics for the OriSNAP and Terdif inter and the intra molecular recombination reactions. The data were plotted according to the disappearing of Lac⁻ colonies versus the length of the induction. Single exponential fits are represented. To avoid taking into consideration the lag observed during the first 5 minutes, the fits exclude the time 0 and 2.5 min of induction.

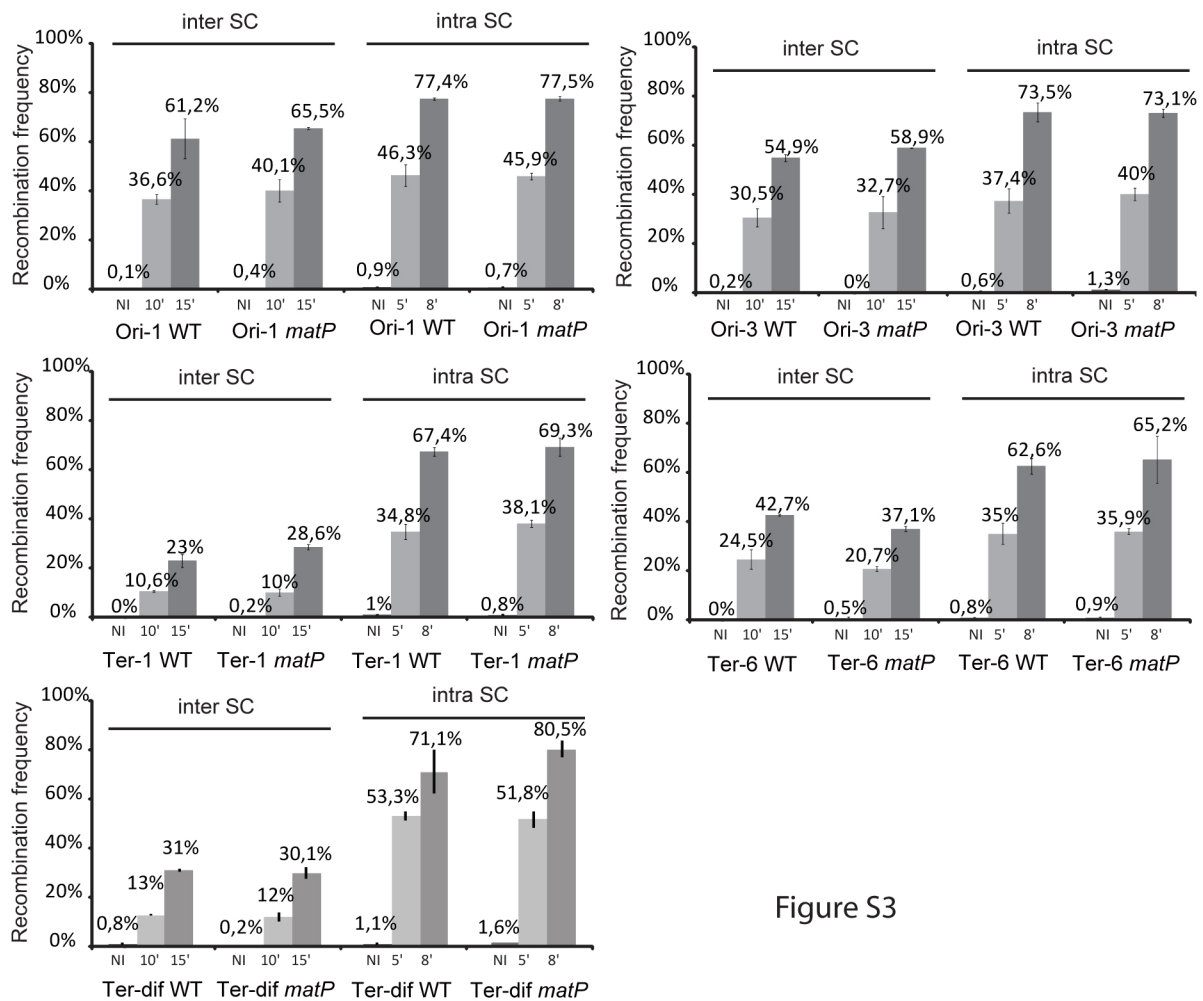


Figure S3

Figure S3. Absolute recombination rate observed in the wt and *matP* strain

Measurement of the frequency of SCI (inter-SC) and intramolecular recombination (intra-SC) according to the extent of Cre induction in the wt and the *matP* strains for the Ori-1, Ori-3, Ter-1, Ter-6 and Ter_{dif} loci. The histograms represent the average of 3 experiments. The induction of Cre recombinase is mediated by arabinose addition for the indicated time. NI (not induced).

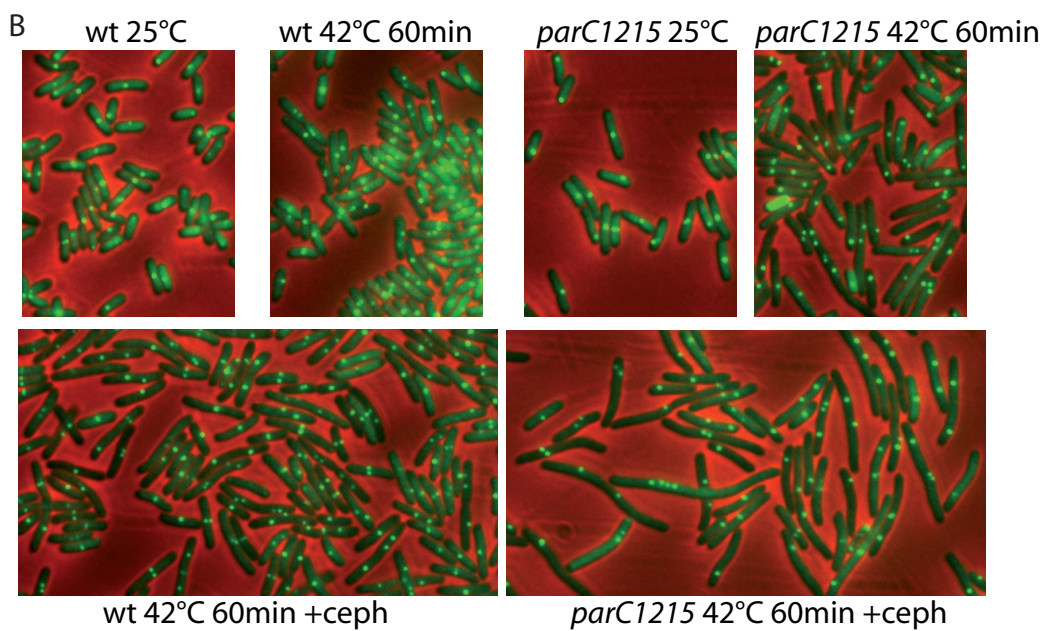
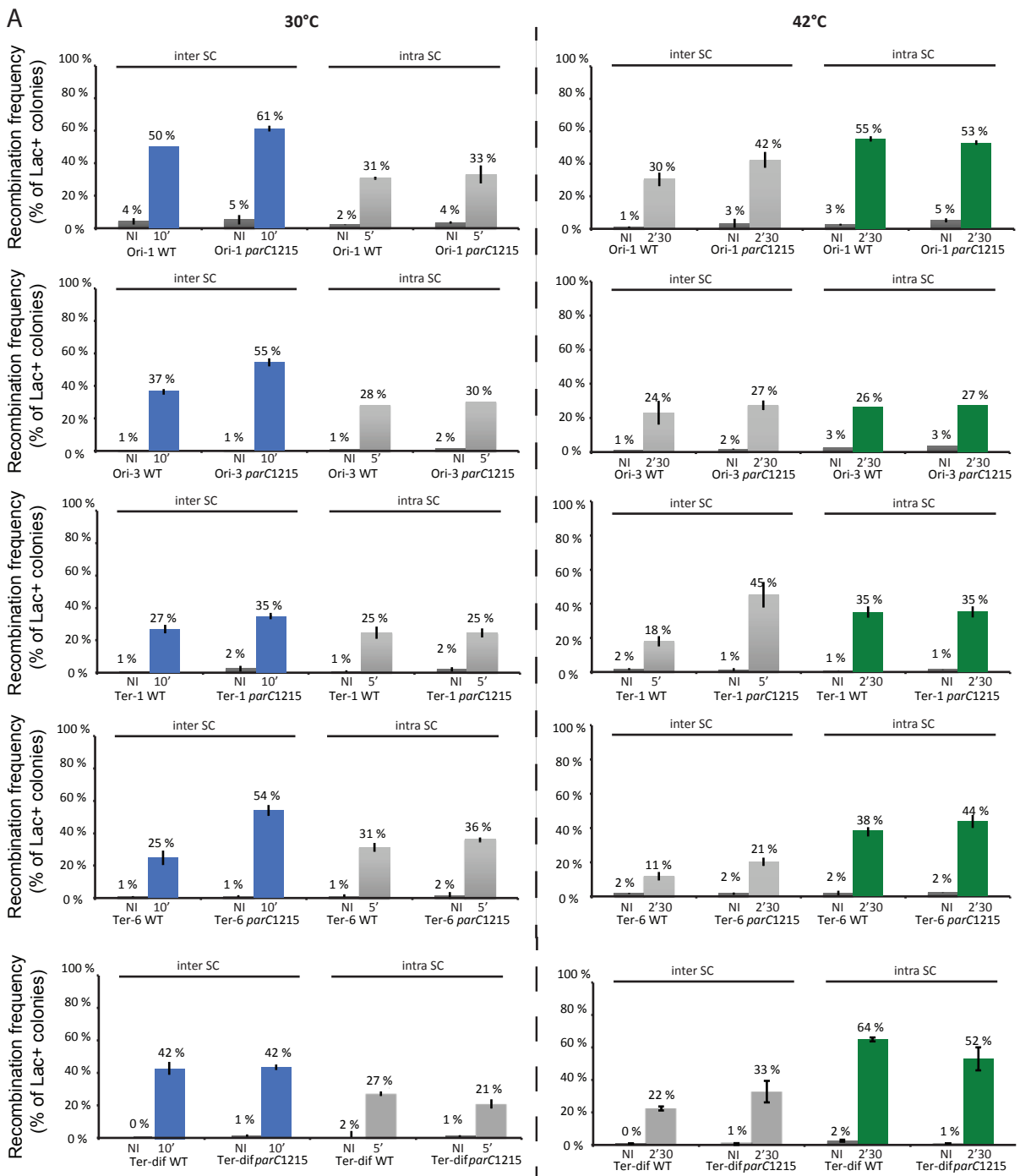


Figure S4

Figure S4. Topo-IV influences SCI and colocalization of the sister chromatids.

A) Absolute recombination rate observed in the wt and *parC1215* strains for the Ori-1, Ori-3, Ter-1, Ter-6 and Ter_{dif} loci. The histograms represent the average of 3 experiments. The induction of Cre recombinase is mediated by arabinose addition for the indicated time. The experiments were performed at 30°C or after a 20 min shift to 42°C. NI (not induced).

B) The inactivation of Topo-IV provokes a reduction in the number of MG1655*parC1215* cells segregating the sister Ter-1 *parS*/ParBP1 foci. A representative picture of the Ter-1 *parS*/ParBP1-GFP tag in the MG1655 and MG1655*parC1215* cells after a 60 min shift at 42°C in the absence or presence of cephalixin to inhibit cell division.

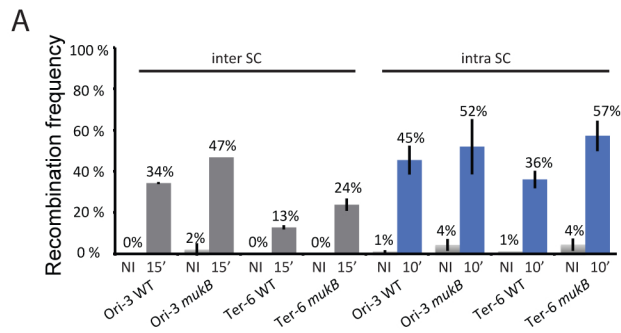


Figure S5

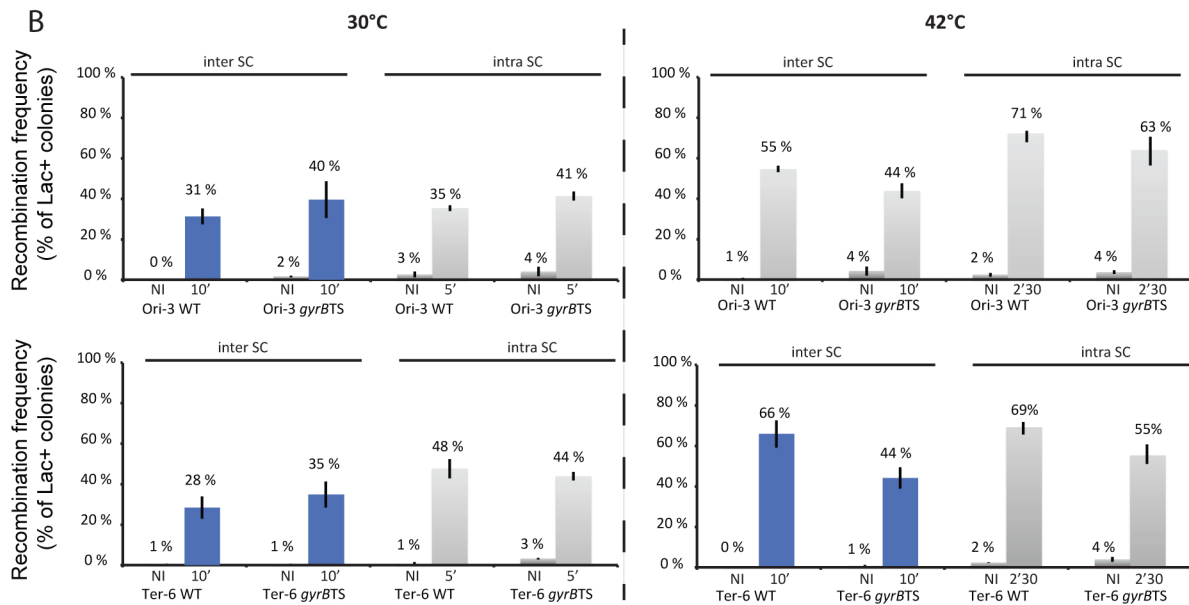


Figure S5. Recombination rates in the *gyrBts* and *mukB* strains.

A) Absolute recombination rate observed in the *mukB* strain. Absolute recombination rate observed in the wt and *mukB* strain. The histograms represent the average of 3 experiments. The induction of Cre recombinase is mediated by arabinose addition for the indicated time. The experiments were performed at 22°C. NI (not induced).

B) Absolute recombination rate observed in the *gyrBts* strain. Absolute recombination rate observed in the wt and *gyrB*²⁰³ strain. The histograms represent the average of 3 experiments. The induction of Cre recombinase is mediated by arabinose addition for the indicated time. The experiments were performed at 30°C or after a 20 min shift to 42°C. NI (not induced).

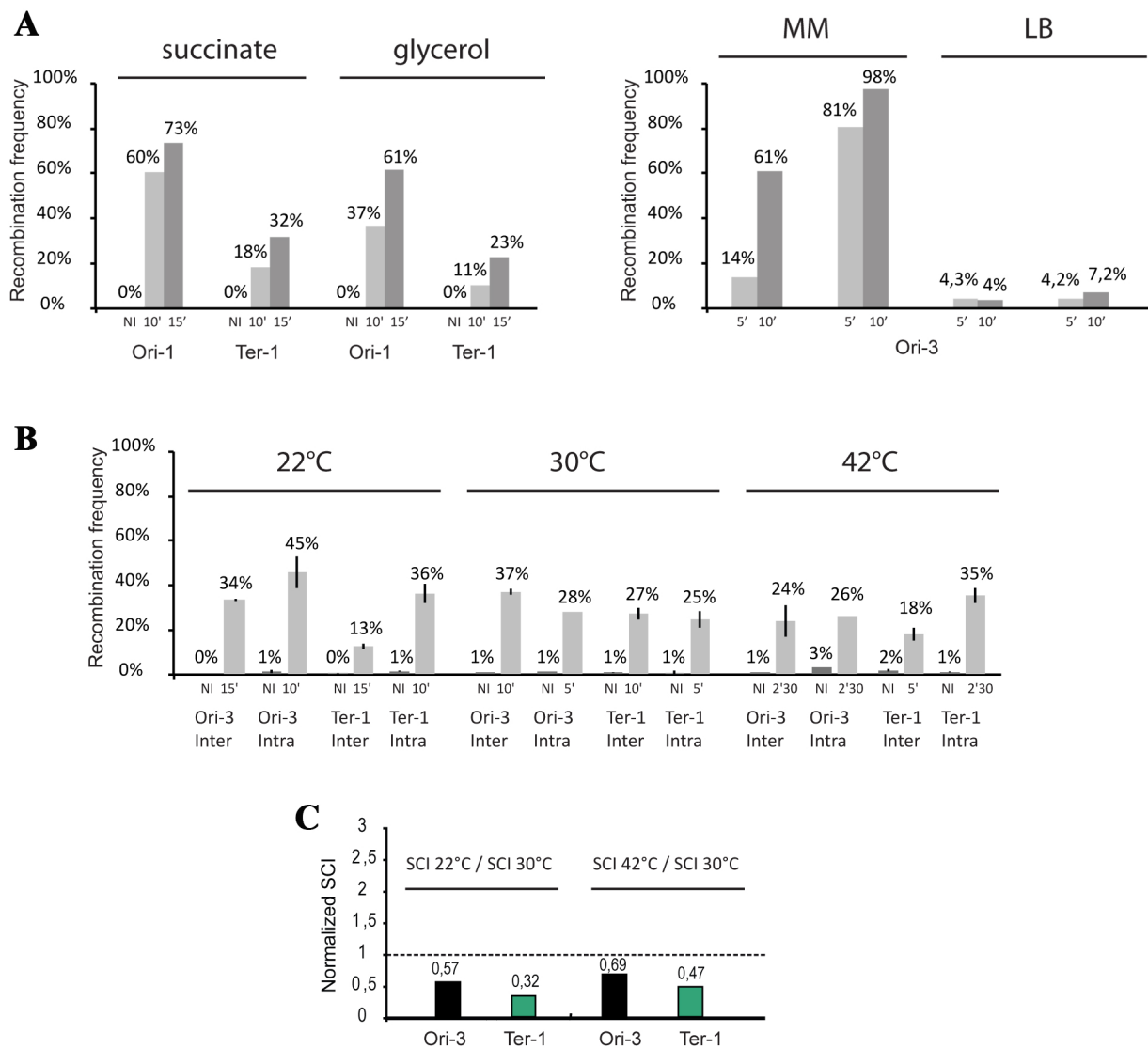


Figure R1: L'influence du cycle cellulaire sur la recombinaison intermoléculaire

A. Les fréquences de recombinaison *laclox* inter et intramoléculaire sont mesurées dans deux milieux différents:

- en milieu pauvre contenant du succinate ou du glycérol, après une induction de 10 et 15 min.
- en milieu pauvre (MM) et en milieu riche (LB), après une induction de 5 et 10 min.

B. Les fréquences de recombinaison *laclox* inter et intramoléculaire sont mesurées à différentes températures: 22°C, 30°C et 42°C en conditions d'induction non saturante.

B. Normalisation des fréquences de recombinaison suivant l'équation:

$$N = (\text{Inter SC } 22^{\circ}\text{C} / \text{Intra SC } 22^{\circ}\text{C}) / (\text{Inter SC } 30^{\circ}\text{C} / \text{Intra SC } 30^{\circ}\text{C})$$

$$N = (\text{Inter SC } 42^{\circ}\text{C} / \text{Intra SC } 42^{\circ}\text{C}) / (\text{Inter SC } 30^{\circ}\text{C} / \text{Intra SC } 30^{\circ}\text{C})$$

III. Calibration du test de recombinaison intermoléculaire

1. Influence du cycle cellulaire sur la cohésion moléculaire

Les expériences d'imagerie permettant d'estimer la colocalisation des chromatides sœurs ont révélé de grandes différences de durée de cette étape en fonction du milieu de croissance et donc vraisemblablement du type de cycle cellulaire (Adachi et al., 2008) (Fossum et al., 2007). Les expériences réalisées avec le test *laclox* nécessitent une induction rapide de la recombinase Cre, une telle induction n'a pu être obtenue avec le promoteur pBAD qu'en milieu minimum supplémenté avec du succinate ou du glycérol. En présence de ces sources de carbone, les cycles cellulaires sont relativement équivalents et les fréquences de recombinaison sont identiques (Figure R1A). En présence de glucose comme source de carbone, l'induction de Cre est impossible dans un intervalle adéquat pour mesurer la cohésion. Dans un milieu riche, l'induction n'est pas très efficace, toutefois un nombre suffisant de recombinants peut être observé pour estimer la cohésion (Figure R1). Le ratio recombinaison intermoléculaire vs recombinaison intramoléculaire est proche de 1 en LB, suggérant que la recombinaison intermoléculaire est possible à tout instant du cycle cellulaire. Ce résultat confirme les observations cytologiques réalisées par les groupes de Hiraga et Skarstad, elles sont en désaccord avec celles du groupe de Austin (Sunako et al., 2001) (Fossum et al., 2007) (Nielsen et al., 2006a).

Les changements de température modifient la durée du cycle cellulaire sans en modifier l'enchaînement et le timing des phases (Espeli et al., 2008). J'ai choisi de mesurer la recombinaison *laclox* à différentes températures pour vérifier la capacité du système *laclox* à mesurer la cohésion des chromatides sœurs dans des cycles plus ou moins long. J'ai observé pour deux positions sur le chromosome, Ori-3 et Ter-1, les fréquences de recombinaison inter et intramoléculaire à 22°C, 30°C et 42°C. (Figure R1B). La recombinaison inter et intramoléculaire augmente avec la température (22°C à 30°C), ce qui est en accord avec une meilleure activité catalytique de Cre. Pour avoir une meilleure appréciation des effets de la température sur la cohésion, nous avons normalisé les différentes fréquences par rapport aux fréquences mesurées à 30°C. Ces rapports nous montrent une diminution des fréquences de recombinaison entre 22°C et 30°C soit un rapport de 0,57 pour Ori-3 et de 0,32 pour Ter-1. De plus, les rapports diminuent aussi lorsque l'on compare les fréquences prises à 42°C par rapport aux fréquences mesurées à 30°C ; 0,69 pour Ori-3 et 0,47 pour Ter-1. Les valeurs

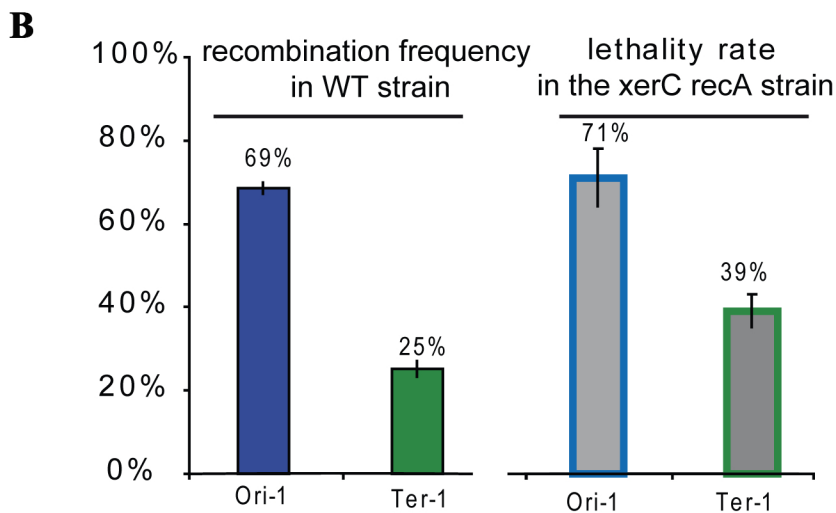
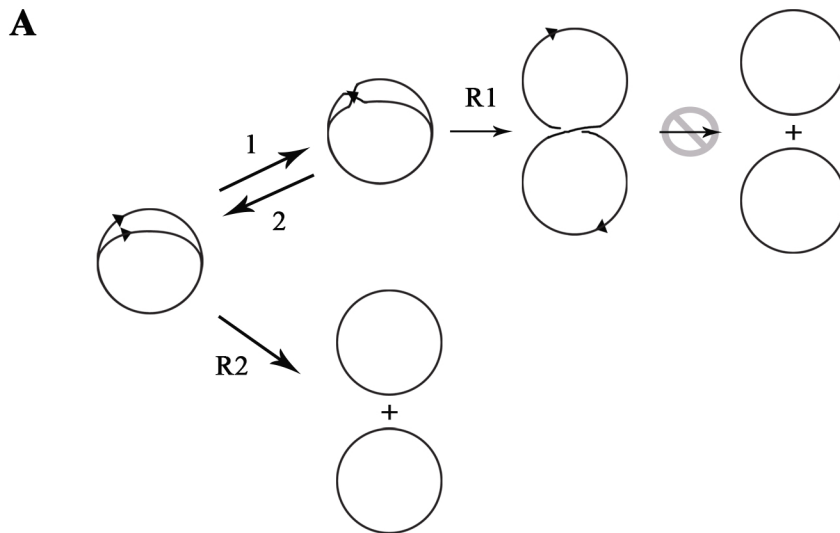


Figure R2: Le système *laclox* intermoléculaire révèle l'interaction entre chromatides soeurs

A. Formation des dimères de chromosomes via le système *laclox*. Au cours de la réplication, un évènement de recombinaison *laclox* interchromatide se produit (1), et forme un lien entre les deux futurs chromosomes. Après réplication complète (R1), les deux chromosomes frères sont entrelacés et ne peuvent se ségréger sans la présence du système de résolution des dimères XerCD/*dif* et conduit à la mort cellulaire. En revanche, si un deuxième évènement de recombinaison *laclox* intervient pendant la période d'échange interchromatide (2), le lien entre les chromatides soeurs est résolu et permet après réplication (R2) de ségréger correctement les deux chromosomes.

B. Les fréquences de recombinaison et les taux de létalité sont mesurées après 15 min d'induction de la recombinase Cre. Les fréquences de recombinaison sont obtenues en calculant le rapport du nombre de colonies bleues par rapport au nombre de colonies totales après étalement sur boîte contenant du X-gal. Les taux de létalité sont calculés par le rapport du nombre de colonies formées sur boîte LB après induction ou non de Cre dans les souches *xerC- recA-*.

basses des rapports de normalisation suggèrent que la recombinaison intermoléculaire est plus efficace à 30°C qu'à 22°C ou 42°C. Ces résultats suggèrent que c'est à 30°C que le maximum de recombinaison intermoléculaire est observé. Mais les effets de mutants thermosensibles peuvent être observés à 22°C ou à 42°C en normalisant les résultats par la fréquence de recombinaison intramoléculaire.

2. Validation du test intermoléculaire : la recombinaison entre chromatides sœurs génère des dimères de chromosomes

La formation de colonies Lac⁺ grâce à la recombinaison intermoléculaire *laclox* peut correspondre à un seul événement de recombinaison ou à une série d'événements enchainés dont le nombre final peut être pair ou impair. Si un nombre impair d'événements se produit, les chromosomes frères fusionneront pour former un dimère de chromosomes. Ce contexte devrait créer une forte dépendance au système de recombinaison XerCD/*dif* pour résoudre les dimères. La mesure de la létalité associée à la recombinaison *laclox* en absence de système de résolution des dimères permet d'estimer la formation de dimères. Les expériences de recombinaison avec le système *laclox* ont été faites dans le contexte où XerC a été délété, dans ces conditions aucune létalité n'est observée et cela même lorsque de fort taux de recombinaison sont observés (data not shown). En contexte *xerC- recA-*, où la résolution des dimères et la recombinaison homologue sont altérées, la recombinaison *loxP* entre chromatides sœurs provoque la létalité des souches (Figure R2). Une induction non saturante de la recombinase Cre (15min), permet d'observer une fréquence de recombinaison en condition sauvage respectivement 69% et 25% pour les positions Ori-1 et Ter-1 (Figure R2B). Les taux de létalité en contexte *recA- xerC-* sont de 71% pour Ori-1 et 39% pour Ter-1 (Figure R2B). Les résultats sont mesurés sur trois expériences indépendantes. Il est important de noter que les erreurs standards des mesures de létalité sont importantes (+/- 10%). Les taux de létalité correspondent aux fréquences de recombinaison retrouvées en contexte sauvage. Ces observations suggèrent qu'un nombre impair de *crossing-over* est majoritairement engendré par la recombinaison *loxP*/Cre. On peut penser que les chromosomes ayant subi un seul événement pendant la durée de l'induction sont majoritaires. En accord avec cette observation une induction saturante de Cre de 30 minutes génère seulement une létalité de l'ordre de 50% des cellules.

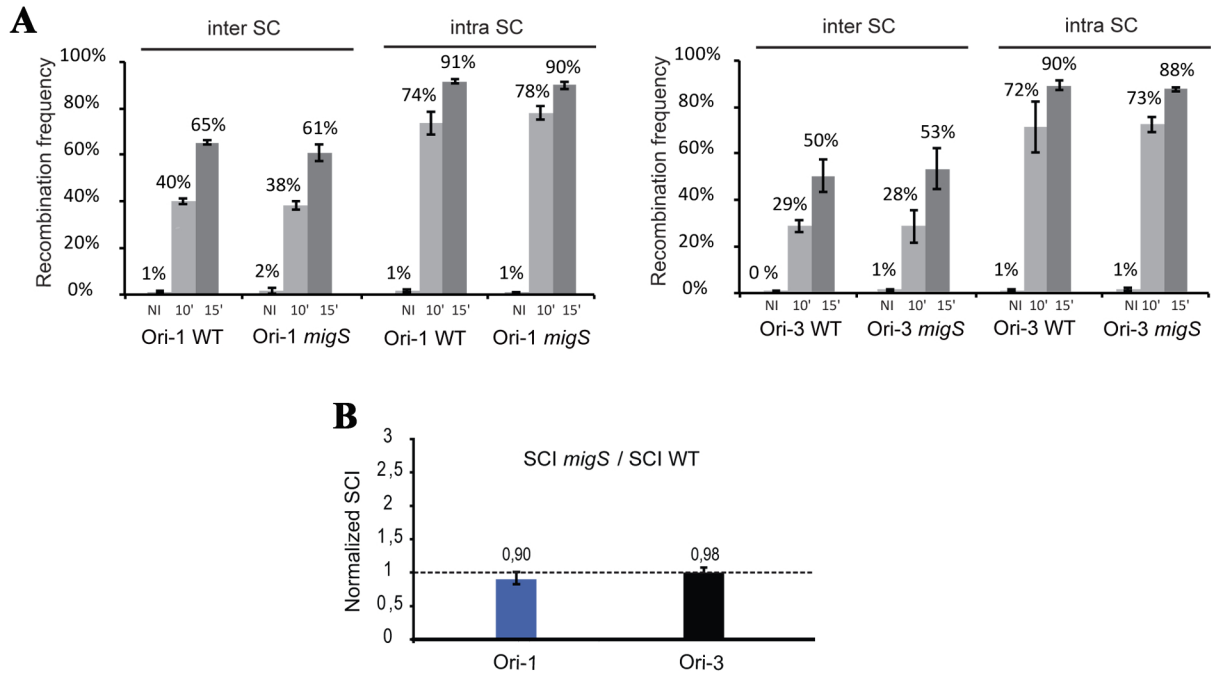


Figure R3: Le site centromérique *migS* n'influence pas la cohésion des chromatides soeurs.

A. Fréquences de recombinaison *laclox* inter et intramoléculaire en absence du site *migS*. Les fréquences sont mesurées après des inductions de 10 et 15min de la recombinase Cre, et étalement sur boîte contenant du X-gal.

B. Normalisation des fréquences de recombinaison suivant l'équation:

$$N = (\text{Inter SC } migS / \text{Intra SC } migS) / (\text{Inter SC wt} / \text{Intra SC wt})$$

IV. Impacts des divers acteurs influençant la colocalisation sur la cohésion des chromatides sœurs

Grâce au système de recombinaison *laclox*, j'ai pu tester le rôle de la séquence *migS*, de la protéine FtsK, de la méthylation de l'ADN tous les trois ayant un rôle dans la colocalisation des chromatides sœurs (Fekete and Chattoraj, 2005) (Li et al., 2003) (Bach and Skarstad, 2004).

1. Le site centromérique *migS* n'influence pas l'interaction entre chromatides sœurs

Le site *migS*, un site centromérique, est impliqué dans la ségrégation du chromosome, en particulier de la région origine. En effet, c'est uniquement après réplication de ce site que les deux copies de la région origine se ségrégent. Nous avons testé l'importance du site *migS* pour la cohésion des chromatides sœurs puisque la ségrégation de la région origine est initiée par la ségrégation de *migS*.

Lors des expériences avec le système *laclox*, nous nous sommes intéressés plus particulièrement à la région origine avec les positions Ori-1 et Ori-3. Ori-1 est situé à 26Kb de *migS* et Ori-3 à 240Kb. Les fréquences de recombinaison ont été mesurées après une induction de 10 et 15min. On peut observer qu'il n'y a pas de changement des fréquences d'interactions en présence ou absence du site *migS* pour les deux positions Ori-1 et Ori-3 (Figure R3A). Par exemple, pour la position Ori-1 en contexte sauvage, on a pu mesurer une fréquence intermoléculaire de 40% et en absence du site *migS* une fréquence de 38% après 10min d'induction. Les fréquences intramoléculaires restent également proches (de 74% à 78%). La normalisation donne un rapport proche de 1, respectivement 0,90 et 0,98 pour la position Ori-1 et Ori-3 (Figure R3B). Ces valeurs montrent que l'interaction entre chromatides sœurs n'est pas dépendante du site *migS*.

2. La méthylation de l'ADN affecte la recombinaison *loxP/ Cre* indépendamment des chromatides sœurs.

La méthylase Dam est responsable de la méthylation de l'ADN hémiméthylé nouvellement synthétisé. Son action de méthylation permet de déloger la protéine SeqA de

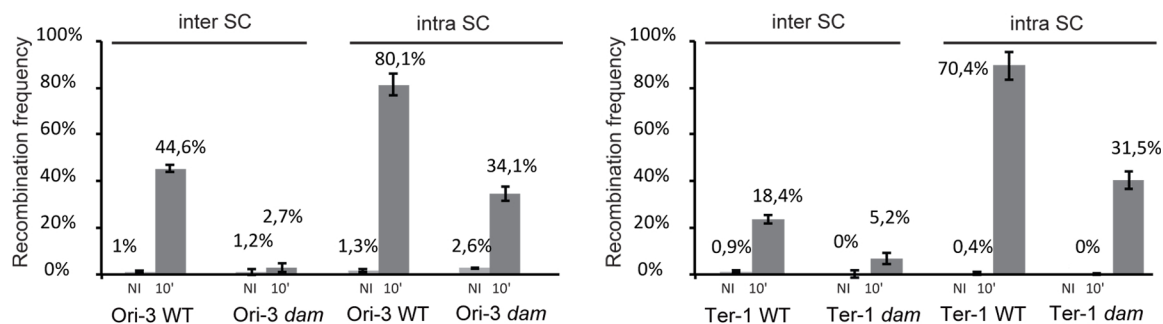


Figure R4: L'impact de la méthylation de l'ADN sur l'interaction entre chromatides soeurs.

Les fréquences de recombinaison *laclox* inter et intramoléculaire ont été mesurées après 10 min d'induction de la recombinaise Cre en présence ou en absence de la méthylase Dam. Les fréquences sont déterminées par le nombre de colonies bleues, ayant recombinaées, par rapport au nombre de colonies total présentes sur boîte LB contenant du X-gal. Deux positions ont été testées: Ori-3 et Ter-1.

l'ADN néo-synthétisé quelques minutes après répliation de chaque loci. Le système SeqA/Dam possède donc des caractéristiques pertinentes pour faire partie du mécanisme responsable de la cohésion. De plus une interaction entre SeqA et la TopoIV a été observée par double hybride, cette interaction stimule l'activité de décaténation de la TopoIV *in vitro* (Kang et al., 2003).

Des expériences avec le système *laclox* ont été effectuées dans une souche *dam-* où la spécificité de SeqA pour l'ADN néo-synthétisée est perdue. Après une induction de 10min de la recombinaise Cre, j'ai mesuré les fréquences d'interactions inter- et intramoléculaires pour les positions Ori-3 et Ter-1. J'observe une diminution de la fréquence de recombinaison inter et intra moléculaire pour les deux positions testées. Les interactions intermoléculaires passent de 44,6% pour la position Ori-3 à 2,7% en absence de Dam, et pour Ter-1 de 18,4% à 5,2% (Figure R4). De façon surprenante, les tests intramoléculaires révèlent également une diminution importante de la fréquence de recombinaison : de 80,1% à 34,1% pour Ori-3 et de 70,4% à 31,5% pour Ter-1 (Figure R4). La diminution importante de la fréquence de recombinaison des sites *loxP* dans les deux systèmes, inter et intramoléculaire, révèle une sensibilité du système à la méthylation des sites de recombinaison. Dans ces conditions il est difficile d'interpréter les résultats en termes de cohésion des chromatides sœurs. Des expériences complémentaires seront nécessaires pour évaluer le rôle de la méthylation de l'ADN et de SeqA sur la cohésion des chromatides sœurs.

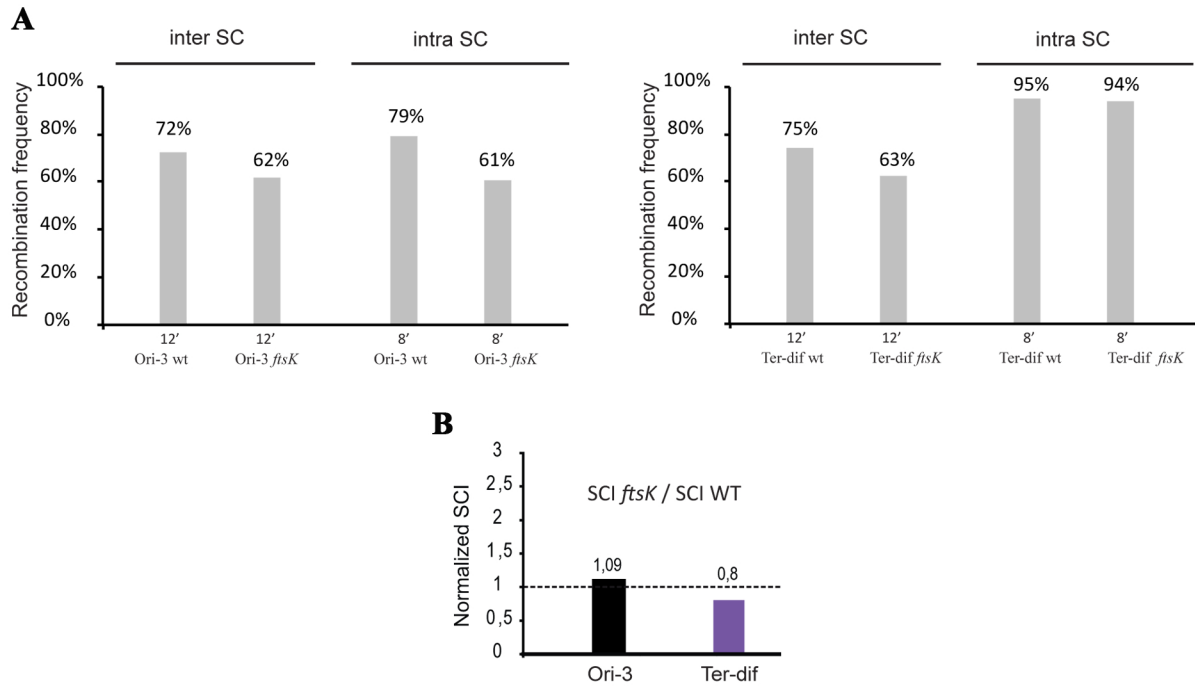


Figure R5 : L'altération de la protéine FtsK n'affecte pas la cohésion des chromatides soeurs.

A. Les fréquences de recombinaison *laclox* inter et intramoléculaire ont été mesurées après 8 et 12 min d'induction de la recombinaison Cre dans un contexte sauvage ou lorsque la région C-terminal de la protéine FtsK est altérée. Après induction, les cultures sont étalées sur boîte LB contenant du X-gal, le pourcentage de bleu représente la fréquence de recombinaison.

B. Normalisation des fréquences de recombinaison en présence de la protéine FtsK fonctionnelle ou altérée, est calculée selon l'équation :

$$N = (\text{Inter } ftsK / \text{Intra } ftsK) / (\text{Inter wt} / \text{Intra wt})$$

3. L'altération du C-terminus de FtsK altère la cohésion entre chromatides sœurs au niveau du locus *Ter-dif*.

L'influence de la délétion du C-terminus de FtsK sur la colocalisation des chromatides sœurs de la région terminale du chromosome a été décrite grâce à l'utilisation du système FROS *parS*/ParBP1 dans une étude pionnière (Li et al., 2003). Ce système est prône à certains artefacts, notamment une augmentation de la colocalisation des chromatides sœurs lorsque la protéine ParB est surexprimée. Depuis cette observation l'effet de la délétion de FtsK n'a jamais été réévalué. J'ai utilisé le système *laclox* pour tester le rôle de FtsK sur la cohésion moléculaire au niveau des loci Ori-3 et *Ter-dif*. La délétion de FtsKc n'affecte pas le ratio recombinaison intermoléculaire / intra moléculaire pour le locus Ori-3 ((Inter/ Intra Δ FtsK)/(Inter/ Intra wt) = 1.09) mais diminue légèrement au niveau du locus *Ter-dif* ((Inter/ Intra Δ FtsK) / (Inter/ Intra wt) = 0.8) (Figure R5). Ce résultat est en accord avec les observations cytologiques mais une étude plus détaillée est nécessaire pour le confirmer.

V. Contraintes topologiques et chromatides sœurs

1. La novobiocine, inhibiteur de l'ADN gyrase, bloque la recombinaison *laclox*

La novobiocine est un inhibiteur des topoisomérases de type II de la famille des coumarines. Contrairement aux quinolones qui bloquent l'activité des topoisomérases après la coupure de la molécule d'ADN, les coumarines inhibent leur activité avant la coupure en se fixant de manière compétitive au site de liaison à l'ATP (Lewis et al., 1996). La principale cible de la novobiocine est l'ADN gyrase (Gellert et al., 1976). Mais elle peut inhiber également l'activité de la TopoIV *in vitro* (Kato et al., 1992) (Peng and Marians, 1993). *In vivo*, son action sur les deux topoisomérases est dépendante de sa concentration (Khodursky et al., 1995). Pour de fortes concentrations, les deux enzymes seraient affectées.

Les tests de recombinaison entre chromatides sœurs ont été fait à une concentration finale de novobiocine de 0, 40 et 400 μ g/ml. Ces concentrations correspondent principalement à l'inhibition de l'ADN gyrase. Après induction de la recombinase Cre de 10min, on a pu mesuré des fréquences d'interaction aux positions Ori-3 et Ter-1 semblables à 0 et à 40 μ g/ml

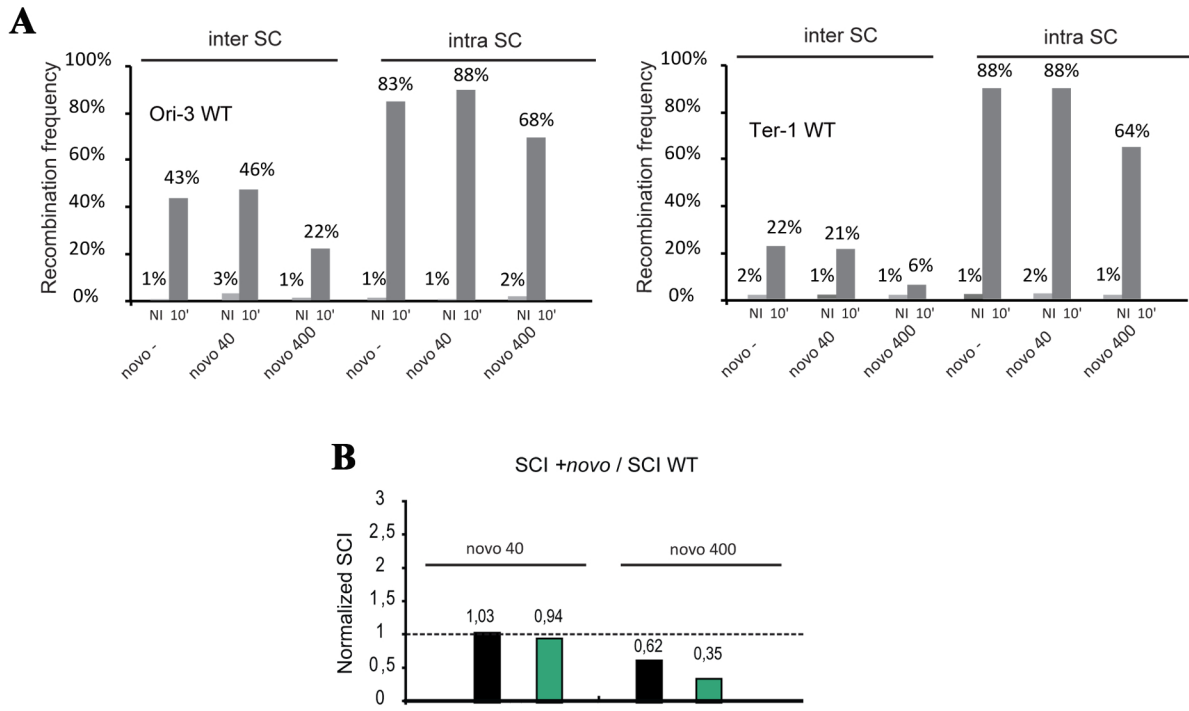


Figure R6 : L'effet de la novobiocine, inhibiteur de la gyrase, sur la recombinaison *laclox*

A. Les fréquences de recombinaison inter et intramoléculaire sont mesurées à différentes concentrations finales de novobiocine: 0, 40 et 400 µg/ml, après 10min d'induction de la recombinaison Cre pour les souches *laclox* à Ori-3 et Ter-1.

B. Normalisation des fréquences de recombinaison en présence de la novobiocine par rapport aux conditions sauvages suivant l'équation :

$$N = (\text{Inter novo} / \text{Intra novo}) / (\text{Inter wt} / \text{Intra wt})$$

de novobiocine, soit respectivement 43% et 46% pour Ori-3 et 22% et 21% pour Ter-1 (Figure R6 A). On note une diminution de la fréquence d'interaction à une concentration plus élevée de 400 µg/ml de novobiocine soit un passage de 43% à 22% pour Ori-3 et de 22% à 6% pour Ter-1 (Figure R6 A). Les mesures des fréquences de recombinaison des tests intramoléculaires révèlent également une diminution des fréquences de recombinaison à 400 µg/ml de novobiocine.

Pour comparer les fréquences de recombinaison dans les différentes concentrations de novobiocine, nous avons normalisé les résultats pour chaque position testée. En présence d'une faible concentration de novobiocine, le rapport de normalisation ne révèle pas d'effet de l'inhibiteur soit un rapport de 1,03 pour Ori-3 et de 0,94 pour Ter-1 (Figure R6 B). La novobiocine à cette concentration ne semble pas pouvoir agir sur les topoisomérases. Pour une plus forte concentration, 400 µg/ml de novobiocine, les rapports sont de 0,62 pour Ori-3 et 0,35 pour Ter-1 (Figure R6 B). La normalisation montre clairement qu'à cette concentration la novobiocine réduit la fréquence de recombinaison entre chromatides sœurs. A cette concentration de novobiocine, l'ADN gyrase seule est inhibée dans une souche sauvage *d'E. coli*. L'inhibition de l'ADN gyrase par la novobiocine provoque une forte diminution des interactions intermoléculaires. On peut penser que l'inactivation de l'ADN gyrase provoque l'arrêt de la réplication et la dissociation des réplisomes (Grompone et al., 2003). Les contraintes topologiques sont alors libres de diffuser de part et d'autre de la fourche et de se dissiper.

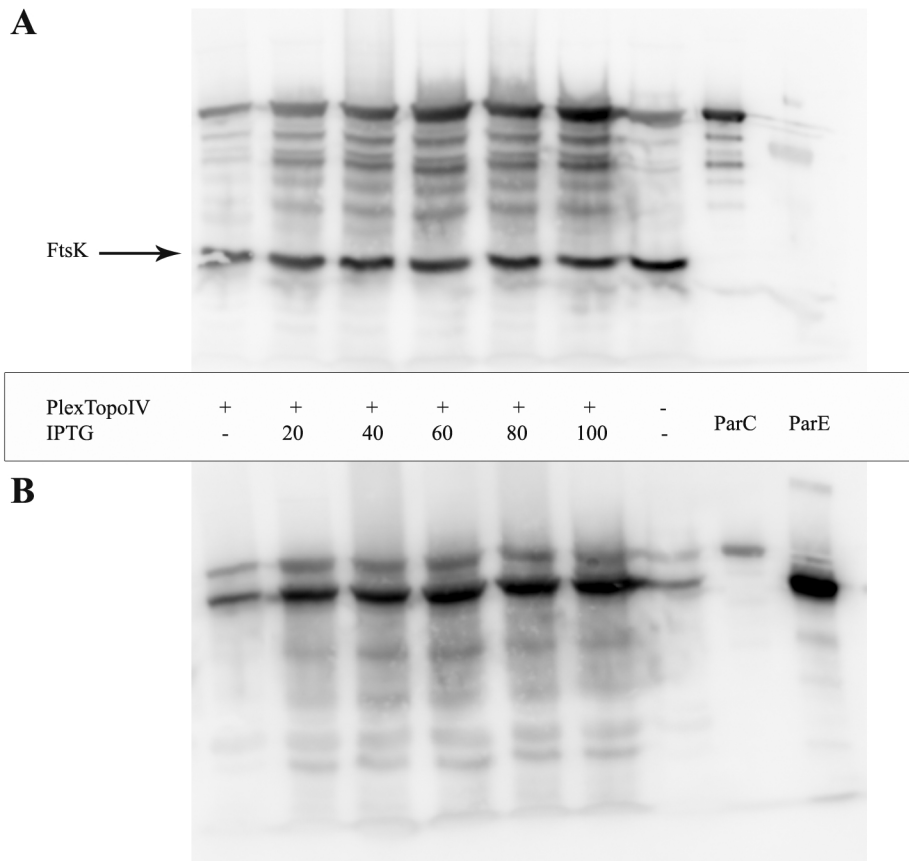


Figure R7 : Test de surexpression de la TopoIV portée par le plasmide pLexTopoIV

Détection par western blot des sous unités ParC (A) et ParE (B) de la TopoIV portées par le plasmide pLexTopoIV inductible en présence de quantité croissante d'IPTG. Un témoin négatif est également testé en absence d'IPTG et du plasmide pLexTopoIV. Des extraits de protéines ParC et ParE sont utilisés comme référence. La protéine FtsK est également détectée lors du western blot en présence des anti-corps anti-FtsK pour témoigner de la quantité de protéines déposées dans chaque puits.

2. La surexpression de la TopoIV réduit les échanges entre chromatides sœurs

L'altération de la TopoIV dans les mutants *parCts* ou *parEts* conduit à une forte augmentation de la fréquence d'interaction entre chromatides sœurs. Cette observation suggère que des liens topologiques unissent les chromatides sœurs. Pour étudier l'effet de la surexpression de la TopoIV sur les tests de recombinaison, nous possédons au laboratoire deux plasmides contenant les deux sous unités de la TopoIV : le plasmide pLexTopoIV où les deux sous unités sont sous le contrôle du promoteur inductible P_{Lex} (contrôlé par LacI) ; et le plasmide pETTopoIV où les deux sous unités sont exprimées de façon consécutive dans une souche MG1655. Les deux plasmides permettent le sauvetage des souches *parEts* et *parCts* à température non permissive.

L'étude de l'expression de la TopoIV codée par le plasmide pLexTopoIV par Western Blot, nous montre qu'en l'absence d'IPTG, les cellules possèdent un niveau d'expression de la TopoIV équivalent au niveau d'une souche ne possédant pas de plasmide pour les deux sous unités parC et ParE (Figure R7 A et B ligne 1 et 7). Les deux sous unités ParC et ParE purifiées sont visible ligne 8 et 9. Les Western Blot ont été fait en duplicate pour permettre la détection en parallèle des deux sous unités ParC en A et ParE en B. Pour estimer les quantités de protéines de chaque échantillon déposé sur gel, nous avons visualisé sur le western blot la protéine FtsZ qui est exprimée de façon constitutive dans les cellules. Nous pouvons voir que la quantité de FtsZ de chaque échantillon est semblable ce qui nous permet de comparer les niveaux d'expression des protéines d'intérêt. Si l'on ajoute des quantités croissantes d'IPTG (Figure R7 A et B lignes 2 à 6), l'expression des deux sous unités ParC et ParE est augmentée et ce dès une concentration de 20 µg/ml d'IPTG en solution.

Nous avons choisi de travailler à une concentration de 20 µg/ml d'IPTG en solution pour effectuer les tests de recombinaison présenté Figure R7. Nous avons testé dans un premier temps avec le plasmide pLexTopoIV la position Ori-3 en présence ou non de l'IPTG. Les fréquences de recombinaison nous montrent une diminution légère des fréquences d'interaction en présence d'IPTG pour les tests inter et intramoléculaire et ce en absence du plasmide pLexTopoIV. Ce résultat est du à la présence sur le plasmide pCre du promoteur anti-sens Lac en 3' du gène *cre* qui contribue à réprimer fortement l'expression de Cre l'expression de la recombinase. En présence du pLexTopoIV, la fréquence de recombinaison intermoléculaire est sensiblement réduite. Le rapport des fréquences de recombinaison en

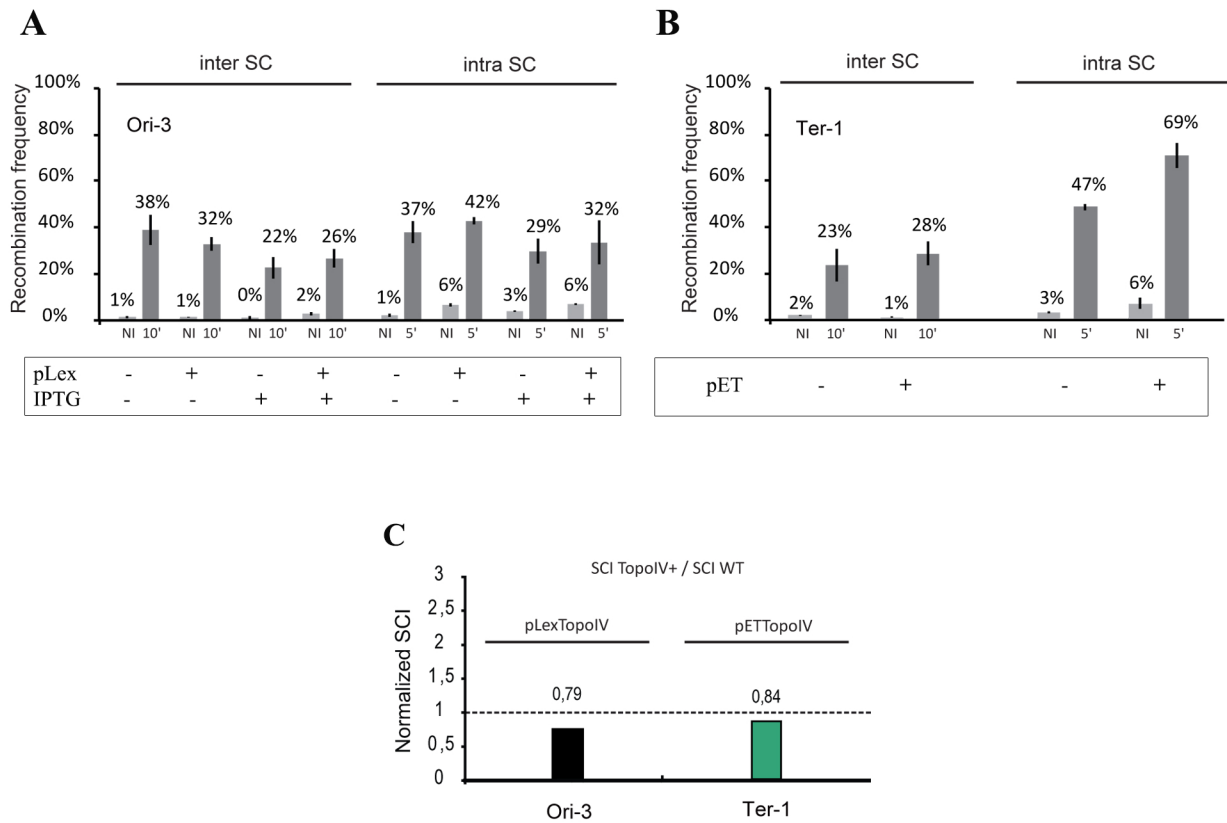


Figure R7 : L'effet de la surexpression de la TopoIV sur l'interaction entre chromatides soeurs

A. Les fréquences de recombinaison inter et intramoléculaire sont mesurées dans des souches contenant le plasmide pLexTopoIV inductible à l'IPTG

B. Les fréquences de recombinaison inter et intramoléculaire sont mesurées en présence du plasmide pETTopoIV qui exprime de façon consécutive les sous unités ParC et ParE.

C. Normalisation des fréquences de recombinaison en contexte de surexpression de la Topoisomérase IV

comparant les souches sauvages aux souches sur-exprimant la TopoIV est de 0,79 (Figure R8).

En parallèle, nous avons testé la surexpression de la TopoIV par le plasmide pETTopoIV qui exprime de façon consécutive les deux sous unités ParC et ParE. Les fréquences de recombinaison montrent une forte augmentation des interactions intramoléculaires. Si l'on normalise les fréquences de recombinaison, le rapport de normalisation révèle une diminution soit un rapport de 0,84 (Figure R8). Ce résultat suggère également que la surexpression de la TopoIV limite la recombinaison intermoléculaire. Que ce soit avec le plasmide pLexTopoIV ou le pETTopoIV, la réduction de la fréquence de recombinaison observée est modeste. Cette observation sera discutée dans la discussion.

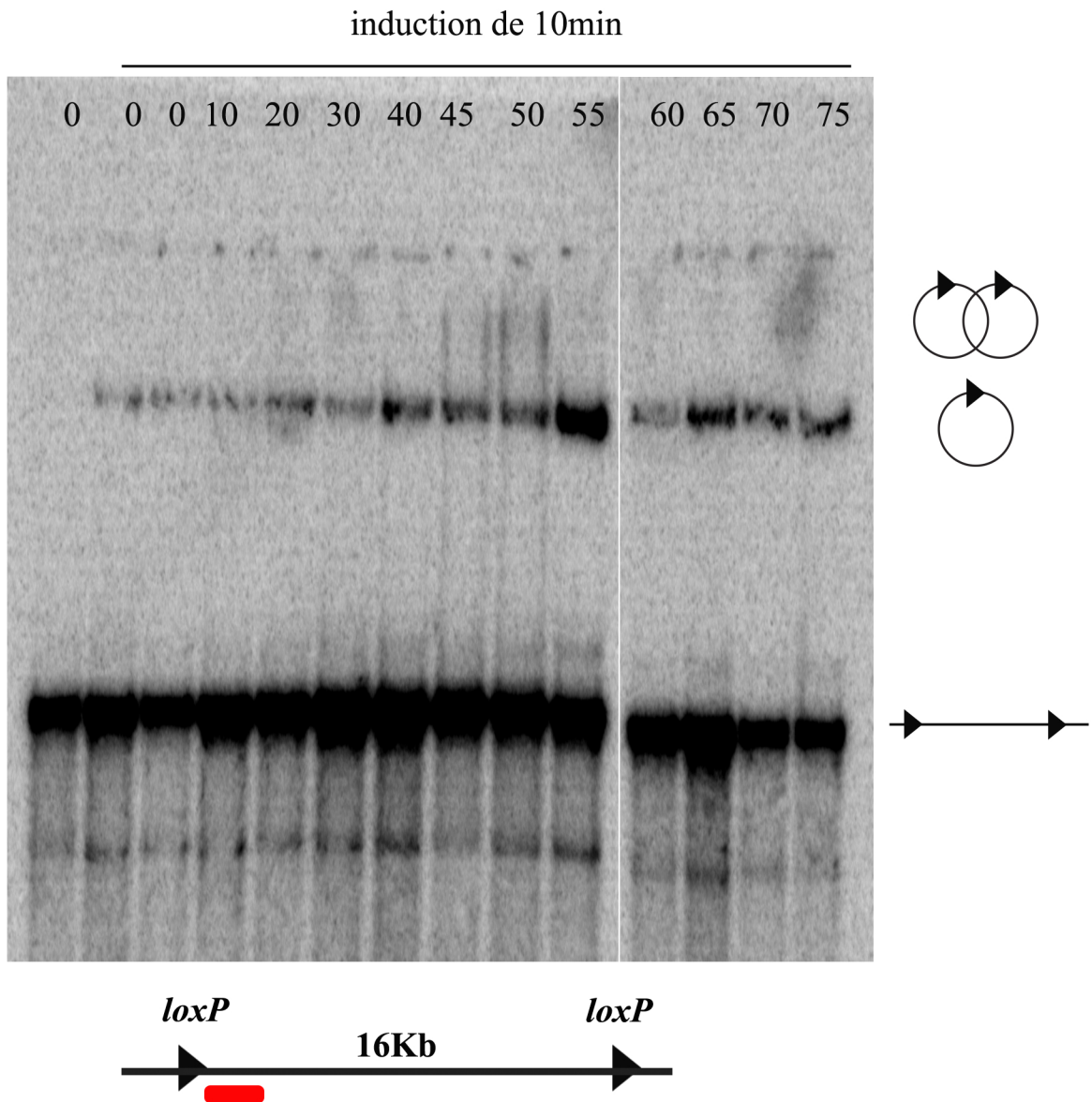


Figure R9 : Détection des précaténanes à l'arrière des fourches de réplication

Grâce à la recombinaison entre deux sites *loxP* distants, les précaténanes seront piégées dans des cercles caténés qui peuvent être détectés par Southern blot après migration sur gel d'agarose et transfert sur membrane. Les cultures cellulaires sont préalablement synchronisées.

Les sites *loxP* sont placés dans la région Ter. La recombinaison Cre est induit durant 10min avant la fixation des cellules pour extraction de l'ADN génomique.

3. Visualisation des précaténanes juste après le passage des fourches de réplication

La présence des caténanes à l'arrière des fourches de réplication est l'hypothèse pour expliquer l'action de la TopoIV sur la période de cohésion des chromatides sœurs mais aussi la présence de cette période de cohésion car aucune cohésine n'a encore été mise en évidence.

Pour prouver l'existence des précaténanes, nous avons mis au point au laboratoire un second test de recombinaison *Cre/loxP*, pour piéger les précaténanes après excision de mini-cercles. Les deux sites en orientation direct sont dans un premier temps placés à une distance de 16Kb l'un de l'autre. La recombinaison entre les deux sites se fait de manière intramoléculaire et génère des mini-cercles chromosomiques qui vont capturer les liens topologiques présents à l'instant donné dans la cellule à une région précise. Nous avons choisi de cibler la région terminale où les précaténanes seraient en plus grands nombres, accumulés en fin de réplication. Nous avons également choisi de synchroniser les cultures cellulaires pour cibler la période du cycle cellulaire où la région d'intérêt, la région terminale, est répliquée. Pour ce premier test, des échantillons de cultures cellulaires ont été pris à différents moments du cycle cellulaire après une induction de 10min. Après extraction et digestion de l'ADN génomique, la région d'intérêt est détectée par Southern Blot (Figure R9). En ligne 1, on peut observer la région d'intérêt non excisée dans des cellules non induites. Puis, après initiation de la réplication et induction de la recombinase de façon indépendante, on peut observer l'apparition de la région excisée qui est présente sous forme de cercle (ligne 2 à 14), ce qui montre que l'excision de la région est possible via notre système de recombinaison. De façon remarquable, on peut observer en ligne 8 et 9, l'apparition d'un dégradé au dessus du cercle excisé. Ce dégradé pourrait correspondre aux cercles caténés qui résultent de l'excision de la région d'intérêt précaténée.

Comme les cercles excisés sont de grandes tailles (16Kb), la visualisation des cercles caténés est difficile par la technique de Southern Blot. Nous avons décidé de réduire la taille du cercle excisé pour permettre sa visualisation sur gel mais aussi permettre d'identifier les liens topologiques qu'ils pourraient posséder. Dans un second test, les sites sont distants d'environ 5,6 Kb. Au cours de tests préliminaires, nous avons pu voir excision des cercles dans une population asynchrone (Figure R10) dans deux milieux pauvres différents, un contenant du glycérol et un autre du succinate. Le second milieu est utilisé au cours des expériences de synchronisation pour améliorer l'efficacité de synchronisation. Sur la première

moitié de la membrane du Southern blot, nous pouvons observer la région d'intérêt non excisée (ligne 1 à 5). On remarque également un dégradé au dessus de la région non excisée (ligne 4 et 5) qui pourrait correspondre aux cercles excisés contenant des liens topologiques. En parallèle, les mêmes échantillons ont été digérés pour permettre la linéarisation des cercles excisés. La région non excisée est toujours détectée avec une taille plus petite (ligne 6 à 10). Les cercles excisés maintenant linéarisés sont détectables dans les 6 premières minutes d'induction dans les deux milieux (ligne 7 et 9). Leur concentration augmente avec le temps d'induction (ligne 8 et 10).

Ces tests d'excision montrent que nous sommes capables de piéger les structures topologiques éventuelles de région du chromosome et nous donne bon espoir pour mettre en évidence la formation de précaténanes à l'arrière des fourches de réplication.

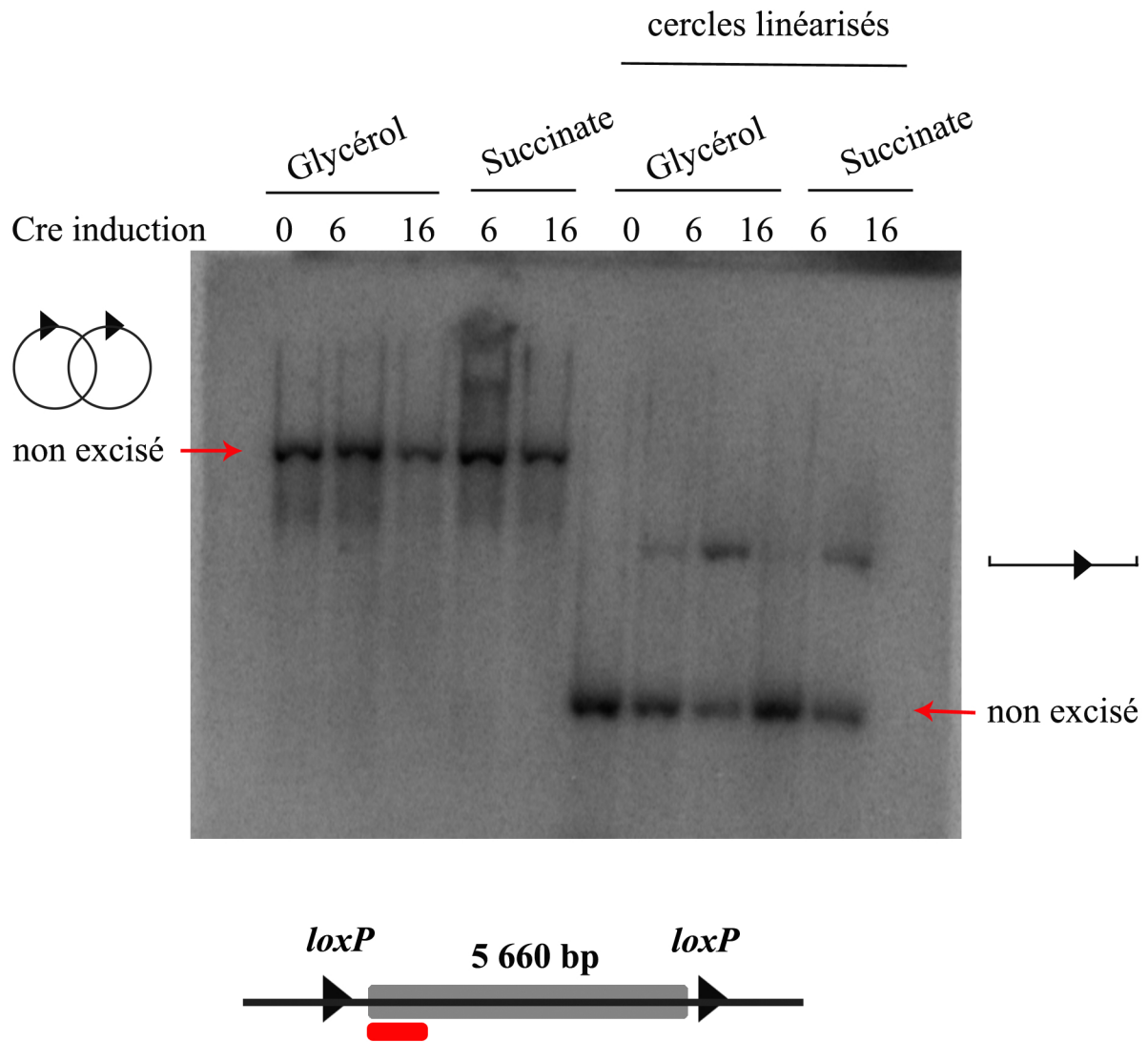


Figure R10 : Détection des précaténanes dans une population cellulaire non synchronisée.

Avec une nouvelle construction où les sites *loxP* sont distants de 5 660 bp, des tests de capture des précaténanes ont été effectués dans deux milieux de croissance pauvre : en présence de glycérol ou de succinate. Après induction de la recombinase Cre (6 et 16min), les cellules sont figées dans de l'azote liquide pour extraction de l'ADN génomique. Les évènements d'excision sont détectés par Southern Blot avec une sonde présente dans le cercle excisé. Les produits excisés par la recombinaison *Cre/loxP* sont analysés après linéarisation ou non des cercles excisés.

VI. Mesure de la fréquence de recombinaison intermoléculaire dans un contexte où l'ADN subit des lésions.

Pour évaluer un rôle putatif de la cohésion moléculaire dans les processus de réparation de l'ADN par recombinaison homologe, j'ai choisi dans un premier temps de mesurer la fréquence de recombinaison intermoléculaire lorsque les cellules sont préalablement incubées avec de la mitomycine C qui va créer des cassures doubles brins et de grands gaps simple brin sur l'ADN. Le locus Ori-3 a été utilisé pour cette analyse. Les cellules sont incubées pendant 0, 30 ou 60 min avec 1 µg/ml de mitomycine C avant l'induction de Cre. La mitomycine C ne modifie pas la fréquence de recombinaison intermoléculaire des souches sauvages. Une légère augmentation de recombinaison est observée après 60 min de traitement (Figure R11). La cohésion entre chromatides sœurs ne semble pas être affectée par les dommages à l'ADN.

L'incubation avec de la mitomycine C provoque une induction du système SOS, parmi les protéines induites se trouve la protéine RecN qui est une protéine de type SMC et dont une activité cohésine a été montrée chez *D. radiodurans*. Nous avons construit une délétion du gène RecN d'*E. coli* et réalisé la même expérience. De manière intéressante la délétion de *recN* provoque une diminution de la fréquence de recombinaison après traitement à la mitomycine C (Figure R12). Ce résultat suggère que RecN pourrait être impliquée dans le maintien de la cohésion des chromatides sœurs lors d'un blocage de fourche de réplication et lors de recombinaisons homologues.

Discussion

La discussion

Au cours de mon travail de thèse, je me suis intéressée à l'étape de cohésion des chromatides sœurs chez la bactérie *Escherichia coli*. Cette étude est composée de deux aspects principaux : la mise en évidence de la période de cohésion moléculaire entre chromatides sœurs et la recherche de déterminants impliqués dans cette étape du cycle cellulaire. J'ai montré que la cohésion moléculaire des chromatides sœurs concerne tous les loci que nous avons étudié pour une durée de 10 à 35 minutes après leur réplication. J'ai mis en évidence l'implication de la Topoisomérase IV dans le maintien de cette cohésion. Mes résultats montrent que la cohésion des chromatides sœurs chez *E. coli* est un processus qui implique deux étapes : une étape de cohésion au sens strict, pendant laquelle les chromatides sœurs peuvent facilement interagir entre elles, et une étape de colocalisation durant laquelle les chromatides sœurs sont maintenues dans un seul territoire subcellulaire mais ne présentent plus d'interactions facilitées.

I. La cohésion des chromatides sœurs chez les bactéries

Colocalisation versus cohésion des chromatides sœurs

Les études de la cohésion des chromatides sœurs ont été principalement menées par l'observation microscopique de la dynamique de marqueurs fluorescents des chromosomes dans la cellule. Ces études permettent d'estimer la colocalisation des marqueurs fluorescents frères après réplication. Cette étape de colocalisation des chromatides sœurs a été appelée cohésion pour rappeler la cohésion retrouvée au cours du cycle cellulaire eucaryote. Les outils de localisation du chromosome utilisés sont principalement la méthode de FROS (Fluorescent Repressor Operon System) et de FISH (Fluorescent In Situ Hybridation). De nombreuses études (Sunako et al., 2001) (Bates and Kleckner, 2005) (Nielsen et al., 2006a) (Adachi et al., 2008) (Espeli et al., 2008) montrent un délai entre le moment estimé de la réplication et le moment de la séparation des chromatides sœurs. Selon les études la durée de la colocalisation des chromatides sœurs est très variable pour un même locus. Par exemple, pour les loci proche de l'origine de réplication, la colocalisation des chromatides sœurs a été estimée à quelques minutes dans certaines études (Nielsen et al., 2007) et à plus d'une heure dans d'autres études (Adachi et al., 2008). Il a également été observé que la colocalisation des chromatides sœurs n'est pas homogène sur le chromosome (Bates and Kleckner, 2005) (Joshi

et al., 2011) (Espeli et al., 2008), elle est dépendante de séquences particulières, *i.e.* les SNAPS (Joshi et al., 2011) et de la topographie des macrodomaines (Espeli et al., 2008) (Mercier et al., 2008). L'hétérogénéité de ces observations faisait de ce sujet un aspect très controversé dans notre communauté scientifique au début de ma thèse. La controverse provient de deux éléments : i) la colocalisation des chromatides sœurs est dépendante des conditions de croissance et du contexte génétique de la souche étudiée (Adachi et al., 2008) ; ii) l'outil de mesure de la colocalisation n'est pas optimum. Pour estimer la colocalisation il faut avoir une parfaite connaissance du moment de réplication du locus analysé. Il est presque impossible d'obtenir cette valeur de manière certaine et son estimation est difficile avec des expériences sujettes à de nombreux artefacts (Nielsen et al., 2007). Un des objectifs de ma thèse a été de développer un nouvel instrument de mesure de la cohésion qui puisse compléter les observations cytologiques. La mesure de la fréquence de recombinaison entre chromatides sœurs grâce au système *laclox* accompagnée de son contrôle intramoléculaire permet d'estimer la durée pendant laquelle un locus donné est dans un contexte où les interactions avec son locus frère sont possibles. Cette estimation ne requiert ni la connaissance de la durée de réplication du locus considéré ni la connaissance du type de cycle cellulaire (chevauchant ou non) suivi par la bactérie. De plus, le système *laclox* ne nécessite pas l'interaction de nombreuses protéines fluorescentes avec l'ADN, susceptibles de perturber la réplication ou la ségrégation des chromosomes (Possoz et al., 2006). Pour l'ensemble de ces raisons le système *laclox* apparaît comme un outil pertinent, complémentaire de la cytologie, pour étudier la cohésion des chromatides sœurs chez *E. coli*, les autres bactéries et éventuellement les eucaryotes. Dans la suite de cette discussion, j'appellerai cohésion les durées déduites de la fréquence de recombinaison *laclox* et colocalisation les durées estimées grâce à l'imagerie d'étiquettes fluorescentes.

Notre étude a révélé que la durée de la cohésion des chromatides sœurs varie selon le locus considéré. Toutefois cette durée est toujours inférieure ou égale à la durée estimée de colocalisation des chromatides sœurs. Par exemple, l'étape de colocalisation est estimée à 31min à la position Ter-1, la cohésion, elle, y est estimée à 10min. Dans le macrodomaine Ter, la colocalisation des chromatides sœurs est dépendante de la protéine MatP (Mercier et al., 2008). J'ai montré qu'en absence de MatP, la durée de la colocalisation est comparable à celle de la cohésion. Ce résultat suggère que MatP permet de prolonger la colocalisation de chromatides sœurs liées depuis leur réplication par un autre mécanisme. Une partie de mes résultats (en annexe (Espéli et al., 2012)) suggère que la colocalisation prolongée des

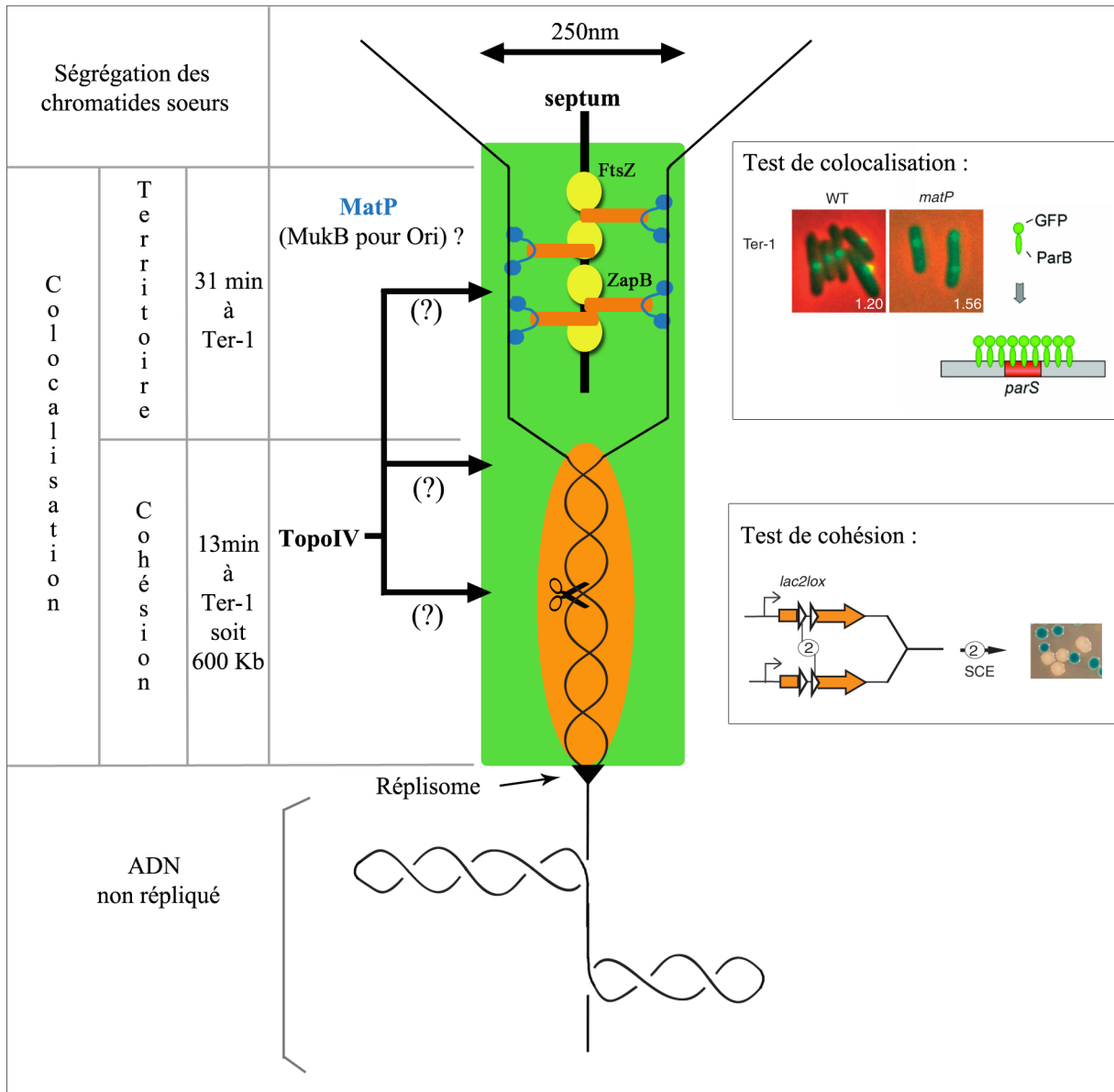


Figure D1 : La colocalisation et la cohésion moléculaire, deux étapes distinctes dans le cycle cellulaire

La période de colocalisation observée par microscopie est représentée en vert et la période de cohésion détectée par recombinaison est en orange. Les étapes du cycle cellulaire sont présentées à gauche, les différents états du chromosome sont schématisés au centre, avec les différents acteurs de la cohésion (TopoIV) et de la colocalisation (MatP, MukB et TopoIV(?)). A droite, sont représentées les techniques employées pour étudier la cohésion (test génétique) et la colocalisation (microscopie à fluorescence).

chromatides sœurs du macrodomaine Ter résulte de l'interaction de MatP avec le septum de division via la protéine ZapB. Les chromatides sœurs ainsi maintenues dans un petit territoire au centre de la cellule ne peuvent être résolues par la microscopie à fluorescence conventionnelle. Il a été montré que la protéine MukB favorise également la cohésion des chromatides sœurs (Danilova et al., 2007). Mes résultats montrent que les interactions entre chromatides sœurs sont inchangées en l'absence de MukB. On peut donc proposer que, comme pour MukB, MatP prolonge la phase de colocalisation en maintenant les chromatides sœurs dans un même territoire.

Les techniques de microscopie à super-résolution permettent d'observer des objets distants de quelques dizaines de nm (>200 nm pour la microscopie à fluorescence conventionnelle). Ces techniques pourraient permettre d'observer directement la cohésion et de la différencier de la territorialisation des chromatides sœurs (Figure D1)

II. La topologie des chromatides sœurs.

1. La caténation des chromatides sœurs eucaryotes

La nature des liens physiques entre les chromatides sœurs a été l'une des premières hypothèses dans l'étude de la cohésion des chromatides sœurs chez les eucaryotes (Koshland and Hartwell, 1987). L'inactivation de la TopoII empêche la séparation des chromosomes répliqués durant l'anaphase. En effet, la TopoII est la principale enzyme capable de résoudre d'éventuels liens de caténation (Holm et al., 1989). Ces résultats suggèrent que les entrelacements générés durant la réplication, les précaténanes, pourraient former des liens physiques entre les chromatides sœurs (Murray and Szostak, 1985). Avec la découverte des cohésines, la démonstration qu'elles créent une liaison forte entre les chromatides sœurs, et la caractérisation du contrôle du cycle cellulaire au niveau des séparases (Nasmyth, 2005), un éventuel rôle des liens topologiques dans la cohésion a été moins développé. Toutefois, en absence de cohésines, la perte de cohésion s'effectue graduellement et peut être retardée jusqu'au début de l'anaphase, cela suggère que d'autres facteurs, éventuellement des précaténanes, participent à la cohésion (Bermejo et al., 2008).

Lors de la réplication de mini-chromosomes (~ 10 to 30 kb) des liens topologiques entre chromatides sœurs se forment, chez les eucaryotes (Lucas et al., 2001) comme chez les bactéries (Peter et al., 1998). Ces liens sont appelés des précaténanes. Il est généralement

admis que les précaténanes se forment aussi lors de la réplication d'un chromosome. Les précaténanes forment des caténanes une fois la réplication terminée. Les précaténanes et caténanes sont résolus durant les phases S, G2 et M par l'action de Topo II (Heck et al., 1988). Ainsi, en métaphase, les caténanes ne sont plus présents sur les chromosomes, n'interférant pas avec la séparation des chromosomes (Wang et al., 2010). La décaténation est surveillée par un *check point* en phase G2 (Downes et al., 1994) dépendant de la kinase ATR (Deming et al., 2002). Les liens topologiques n'auraient donc le potentiel d'influencer la cohésion qu'en phase G2. Récemment le groupe de K. Nasmyth (Farcas et al., 2011) a montré que les liens de caténation sont en réalité présents en grande quantité sur des mini-chromosomes (26Kb) en métaphase chez *S. cerevisiae*. Le niveau de caténation est augmenté avec la taille des plasmides. Ils ont pu également observer la présence de caténanes sur des mini-chromosomes linéaires piégés dans des complexes avec des cohésines verrouillées. De manière intéressante la présence de cohésine semble limiter la décaténation, les cohésines favoriseraient ainsi la cohésion via le maintien de liens topologiques entre chromatides sœurs. Leur modèle propose que les derniers liens de cohésion soient des liens topologiques. Il a été proposé qu'en métaphase, la tension engendrée par le fuseau mitotique pourrait forcer la TopoII vers son activité de décaténation des chromatides sœurs aux sites de cohésion (Baxter et al., 2011); toutefois il a été observé depuis longtemps que les chromosomes acentriques sont efficacement séparés en anaphase (Giménez-Abián et al., 2002). Les liens de caténation entre chromatides sœurs semblent donc être un élément de la cohésion entre chromatides sœurs.

2. Comment les précaténanes peuvent ils maintenir la cohésion d'un chromosome en cours de réplication ?

Un précaténane correspond à un supertour positif qui se forme dans la région d'ADN répliqué, c'est un entrelacement des deux copies du chromosome répliqué. Il peut se former par diffusion vers l'arrière des tensions positives accumulées en avant de l'ADN polymérase en déplacement (Postow et al., 1999) (Liu and Wang, 1987). Le surenroulement positif généré en amont de la réplication est contrôlé essentiellement par l'ADN gyrase. Mais, dans certaines conditions, par exemple la rencontre de l'ADN polymérase avec une barrière topologique, ces supertours positifs pourraient s'accumuler. Pour qu'ils puissent diffuser en aval de la fourche de réplication il faut soit que le réplisome puisse tourner sur lui-même, soit que le réplisome se détache et que les chromatides sœurs soient libres de s'enrouler (Espeli and

Marians, 2004). Lorsque l'ADN gyrase est limitante la réplication est fréquemment arrêtée et le réplisome désassemblé puis réassemblé de façon PriA dépendante (Grompone et al., 2003). Cette observation suggère que la formation de précaténanes en contexte *gyrBts* passe par l'intermédiaire d'un désassemblage des réplisomes. Cette solution, couteuse en énergie et en temps pour la cellule, peut-elle se produire fréquemment dans une cellule sauvage à la rencontre des 400 barrières topologiques du chromosome ? La rotation des réplisomes est-elle possible ? Chez *E. coli*, il est maintenant proposé que chaque réplisome est indépendant pendant une grande partie de la phase C, mais chez de nombreux organismes bactériens et eucaryotes on observe une colocalisation des réplisomes en un complexe appelé *DNA factory* (Lemon and Grossman, 2000). Pour ne pas tresser les deux bras de réplication entre eux, il faudrait que les réplisomes puissent tourner indépendamment. Il n'est pas facile d'imaginer un complexe qui permette à la fois d'associer fortement les réplisomes et de leur permettre de tourner sur eux-mêmes indépendamment. Le mécanisme qui permettrait à la cellule la formation d'une grande quantité de précaténanes n'est clairement pas encore connu.

Le test d'interaction entre chromatides sœurs suggère que les liens de précaténation sont responsables de la cohésion des chromatides sœurs. La durée de la cohésion pour un locus donné est estimée en moyenne à 20 minutes après réplication de ce locus. La réplication progresse à 46 kb / min dans les conditions de nos expériences. On peut donc proposer qu'environ 1Mb d'ADN soit impliqué dans la cohésion (Figure D1). Combien de précaténanes sont requis pour maintenir 1Mb cohésif ? Comment la cellule limite-t-elle l'accès à ce Mb d'ADN pour la TopoIV ? L'ensemble de ces questions fait l'objet des perspectives de cette thèse.

La dernière partie de ma thèse a constitué à mettre en place une mesure directe de la précaténation sur le chromosome d'*E. coli*. Par une approche génétique faisant appel à la recombinaison de site spécifique distant sur le chromosome, nous avons pu exciser des régions chromosomiques sous formes de mini-cercles. L'utilisation de population de cellules dont le cycle cellulaire est synchronisé, permet de cibler précisément le moment où le site d'intérêt est répliqué augmentant la quantité de matériel à analyser. Des expériences de Southern blot nous révèlent l'existence de formes de plus hauts poids moléculaires que les mini cercles monomères. Il pourrait s'agir de deux mini-cercles caténés, ce qui prouverait l'existence de précaténanes sur le chromosome et nous permettrait de mesurer leur densité.

III. Les acteurs de la cohésion moléculaire chez les bactéries

1. Le contrôle de la TopoIV

La TopoIV est une enzyme qui intervient dans plusieurs aspects du métabolisme de l'ADN. Elle permet le contrôle du niveau de surenroulement de l'ADN (Zechiedrich et al., 2000) mais surtout de défaire les entrelacements entre deux molécules d'ADN (Zechiedrich et al., 1997b). Il a été montré que son action est concentrée en fin de cycle cellulaire (Espeli et al., 2003b). La localisation des deux sous unités qui la composent, conforte l'idée d'une intervention tardive dans le cycle cellulaire car ParC est colocalisé avec le réplisome, alors que ParE est libre dans le cytoplasme. A la fin de la réplication, ParC serait relâché du réplisome et pourrait donc interagir avec ParE. A ce moment du cycle cellulaire son interaction avec la protéine du septum, FtsK, favoriserait son activité de décaténation (Espeli et al., 2003a) (Bigot and Mariani, 2010).

La TopoIV possède d'autres partenaires dans la cellule. TopoIV peut également interagir avec SeqA qui reconnaît les séquences GATC hémi-méthylées après la réplication (Kang et al., 2003). SeqA stimule l'activité de la TopoIV. En interaction avec SeqA, l'activité de la TopoIV ne serait pas limitée à la fin du cycle cellulaire. La TopoIV interagit également avec la protéine MukB, cette interaction stimule son activité sur les supertours positifs. Nos résultats sont en accord avec cette observation, la cohésion est légèrement augmentée dans les mutants *mukB*.

Les travaux de Ludovic Le Chat au laboratoire montrent que la TopoIV se fixe préférentiellement à quatre sites de liaison sur le chromosome mais d'autres sites de fixation, plus rarement utilisés, pourraient être présents. Ces quatre sites sont spécifiques et ne varient pas en fonction des phases du cycle cellulaire. Trois de ces sites sont situés dans la région terminale de réplication, ils pourraient permettre la décaténation des chromosomes répliqués en fin de cycle cellulaire lorsque FtsK active la TopoIV. Peut-on expliquer l'influence de la TopoIV sur la cohésion par sa fixation sur les autres sites du chromosome ? Cette observation nous oriente vers un modèle où les liaisons topologiques entre chromatides sœurs seraient rompues en quelques loci spécifiques répartis sur le chromosome. Il est intéressant de noter que dans un cycle cellulaire synchronisé la cohésion des chromatides sœurs des régions originaires se termine bien avant la fin de la réplication du chromosome. Une analyse des

interactions entre chromatides sœurs à plus haute densité sera nécessaire pour caractériser le mécanisme de séparation des chromatides sœurs.

2. Existe-t-il une cohésine non identifiée ?

Jusqu'à présent les études sur la cohésion des chromatides sœurs chez les bactéries étaient menées par l'intermédiaire de la microscopie à fluorescence. Aujourd'hui, le développement d'un outil génétique a permis de mettre en avant les désavantages de la microscopie dans cette étude de proximité spatiale entre régions chromosomiques. Cet outil nous a déjà permis d'écarter des facteurs protéiques impliqués dans la ségrégation et la structuration du chromosome mais dont le rôle dans la cohésion n'est pas validé par le système de recombinaison (MatP, MukBEF, *migS*). Jusqu'à présent nous avons pu mettre en évidence le rôle direct de la TopoIV dans le maintien de la cohésion moléculaire. Les études préliminaires ont montré que RecN, une protéine SMC de la réparation, influencerait la cohésion moléculaire lors de l'induction SOS. RecN est induite uniquement en présence de cassures sur l'ADN, elle spécifierait donc une étape de cohésion particulière pour la réparation de l'ADN. Le système de recombinaison *laclox* est adéquat pour cribler une collection de mutants à la recherche d'un mutant ayant une cohésion réduite. Nous envisageons ce type d'approche pour identifier une éventuelle cohésine bactérienne. Une approche comparable avec une banque de surexpression pourrait être utilisée pour identifier une éventuelle séparase.

3. IV Le rôle de la cohésion des chromatides sœurs

Chez les eucaryotes, la cohésion des chromatides sœurs est impliquée directement dans le contrôle de la ségrégation et dans les mécanismes de réparation de l'ADN par recombinaison homologue (pour revue, (Nasmyth and Haering, 2009)). Les cohésines influencent également l'expression des gènes (Dorsett and Ström, 2012), la vitesse de réplication (Terret et al., 2009) et le repliement spatial des chromosomes (Seitan and Merckenschlager, 2012) de manière indépendante de la cohésion. La fonction de la cohésion des chromatides sœurs chez *E. coli* n'est pas encore définie. On pourrait envisager des rôles similaires. Le groupe de Nancy Kleckner propose un modèle de ségrégation des chromatides sœurs où la force motrice est la répulsion entre molécules d'ADN néo synthétisées. Ce modèle implique une étape de cohésion entre chromatides sœurs qui permet d'emmagasiner

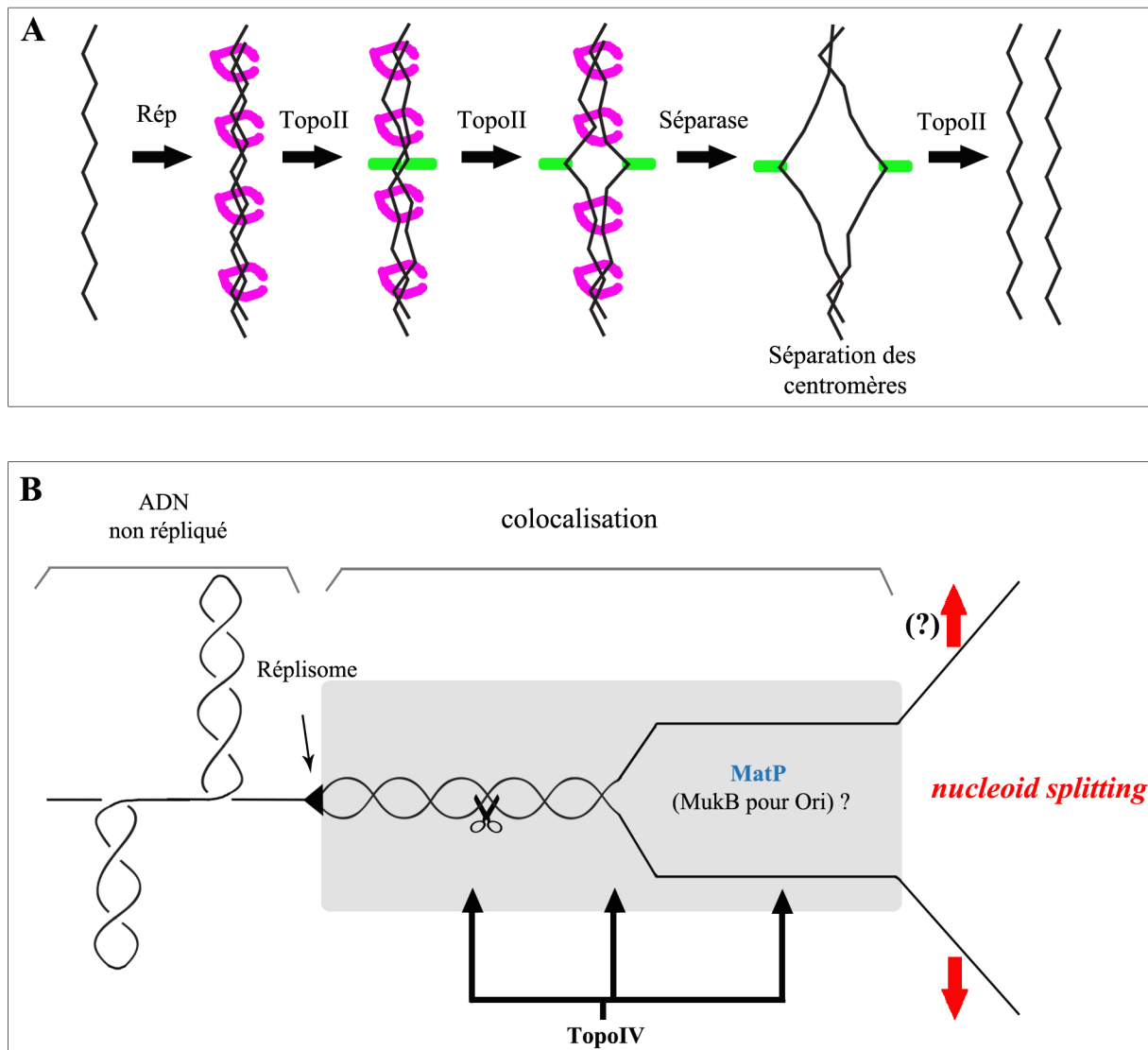


Figure D2 : Modèle de cohésion des chromatides soeurs avant leur séparation active

A. Représentation schématique des liens de caténation au cours du cycle cellulaire eucaryote. Durant la réplication (Rép), les cohésines (en rose) sont chargées sur l'ADN pour maintenir les chromatides soeurs cohésives. La TopoII vient décaténer les chromatides soeurs pendant la phase S et G2 mais les liens ne sont pas complètement résolus. Après abolition de la cohésion par l'action des séparases, la TopoII vient défaire les derniers liens de caténation des chromatides soeurs subissant la tension séparatrice du fuseau mitotique (en vert).

B. Représentation des forces contraignant l'ADN répliqué chez les bactéries. La TopoIV vient résoudre les liens de précaténation qui maintiennent les chromatides soeurs cohésives. Les protéines MatP et MukB préviennent la séparation précoce des chromatides soeurs. Le *nucleoid slitting* (flèche rouge) est la séparation abrupte des chromatides soeurs observée au microscope.

l'énergie. La rupture de la cohésion simultanément sur une grande région des chromosomes frères provoquerait une séparation abrupte des nucléoïde frères, le *nucleoid splitting* (Bates and Kleckner, 2005). Ce modèle de ségrégation n'a pas encore été testé expérimentalement. Il n'est toutefois pas vraiment compatible avec nos observations d'une rupture de la cohésion progressive quelques dizaines de minutes après la réplication.

Nos résultats suggèrent que la cohésion moléculaire disparaît rapidement lors d'une inhibition de l'activité gyrase (*gyrBts* ou après traitement à la novobiocine). Ainsi, il semble que les liens topologiques entre chromatides sœurs disparaissent rapidement après blocage des fourches de réplication. Il apparaît donc peu probable que la cohésion moléculaire participe au redémarrage des fourches de réplication. L'incubation des cellules avec de la mitomycine C bloque également l'avancée des fourches de réplication et provoque des cassures double brin de l'ADN. Le traitement à la mitomycine C ne modifie pas la fréquence d'interaction entre chromatides sœurs. A la différence de l'inhibition de la gyrase, la mitomycine C induit la réponse SOS (Walker, G. C., 1996). Parmi les gènes du régulon SOS, *recN* code pour une protéine de type SMC dont l'activité de cohésine a été montrée *in vitro* chez *D. radiodurans* (Reyes et al., 2010). La protéine RecN est impliquée dans la réparation par recombinaison de cassures doubles brins (Kidane et al., 2004). En absence de RecN, la fréquence de recombinaison entre chromatides sœurs est réduite lors d'un traitement à la mitomycine C. RecN pourrait servir de cohésine et donc suppléer les liens topologiques lors de cassures de l'ADN. Une hypothèse alternative pourrait être que RecN joue un rôle de barrière pour limiter la dissipation des précaténanes et ainsi maintenir les chromatides sœurs à proximité l'une de l'autre (Figure D2). En accord avec ces modèles, il a été observé que RecN, chez *B. subtilis*, forme des foci en réponse à des lésions de l'ADN et que ces foci sont sur le nucléoïde mais distincts des foci formés par le réplisome (Mascarenhas et al., 2006). Un maintien de la cohésion des chromatides sœurs est donc programmé lors de la réponse SOS. On peut donc penser que, chez les bactéries aussi, cette étape est importante dans la réparation des cassures de l'ADN et ainsi qu'elle est impliquée dans la stabilité du génome bactérien.

Au niveau du macrodomaine Ter, l'étape de cohésion est couplée à une étape de colocalisation contrôlée par MatP et ZapB. L'intérêt pour la cellule de maintenir les chromatides sœurs du macrodomaine Ter à proximité du septum de division n'est pas encore compris. Il est intéressant de noter que ce processus, de manière MatP dépendante ou indépendante, est conservé chez *V. cholerae*, *B. subtilis*, *C. crescentus* et *P. aeruginosa* soit l'ensemble des bactéries chez qui la localisation de la région Ter a été observée (Brézellec et

al., 2006)(Possoz et al., 2012). De manière anti corrélée, les sites de liaison des protéines SImA ou Noc, qui évitent la guillotine du chromosome par le septum, sont exclus de la région terminale du chromosome (Wu et al., 2009). Ce double contrôle suggère qu'il existe une forte pression de sélection pour maintenir les chromatides sœurs du macrodomaine Ter proche du septum.

Annexe

Annexes

I. Présentation de l'article : « A MatP-divisome interaction coordinates chromosome segregation with cell division in *E. coli* »

1. Résumé de l'article

L'étape de cohésion entre les chromatides sœurs est essentielle dans le cycle cellulaire eucaryote et contrôle plusieurs processus cellulaires comme la ségrégation des chromosomes ou la réparation de l'ADN. La cohésion moléculaire n'a jamais été décrite chez la bactérie *Escherichia coli*. Les études antérieures font l'état d'une étape de colocalisation des régions nouvellement répliquées après observation au microscope à fluorescence. Plusieurs facteurs ont été mis en évidence comme influençant cette étape de colocalisation. Cependant, la cohésion moléculaire n'a pas encore été démontrée. Afin de mettre en évidence cette étape du cycle cellulaire et faire un lien avec les observations de colocalisation par les outils cytologiques, nous avons développé un outil génétique faisant appel à la recombinaison de site spécifique, les sites *loxP*, via la recombinase Cre. Nous avons pu démontrer que les chromatides sœurs existe durant une courte période après la réplication. L'étude de cette étape de cohésion a permis de mettre en avant de nombreuses différences entre la colocalisation et la cohésion moléculaire. En effet, les acteurs de la colocalisation ne semblent pas influencer la cohésion des chromatides sœurs. Par contre, la modulation de l'activité de la Topoisomérase IV révèle son implication dans cette étape de cohésion et que les liens topologiques de l'ADN moduleraient la cohésion.

A MatP–divisome interaction coordinates chromosome segregation with cell division in *E. coli*

Olivier Espéli^{1,*}, Romain Borne²,
Pauline Dupaigne, Axel Thiel,
Emmanuelle Gigant¹, Romain Mercier³
and Frédéric Boccard*

Centre de Génétique Moléculaire du CNRS (UPR3404), Associé à l'Université Paris-Sud, Gif-sur-Yvette, France

Initiation of chromosome segregation in bacteria is achieved by proteins acting near the origin of replication. Here, we report that the precise choreography of the terminus region of the *Escherichia coli* chromosome is also tightly controlled. The segregation of the terminus (Ter) macrodomain (MD) involves the structuring factor MatP. We characterized that migration of the Ter MD from the new pole to mid-cell and its subsequent persistent localization at mid-cell relies on several processes. First, the replication of the Ter DNA is concomitant with its recruitment from the new pole to mid-cell in a sequential order correlated with the position on the genetic map. Second, using a strain carrying a linear chromosome with the Ter MD split in two parts, we show that replisomes are repositioned at mid-cell when replication of the Ter occurs. Third, we demonstrate that anchoring the Ter MD at mid-cell depends on the specific interaction of MatP with the division apparatus-associated protein ZapB. Our results reveal how segregation of the Ter MD is integrated in the cell-cycle control.

The EMBO Journal advance online publication, 11 May 2012; doi:10.1038/emboj.2012.128

Subject Categories: cell cycle; genome stability & dynamics
Keywords: divisome; macrodomain; MatP; replication factory; ZapB

Introduction

The development of fluorescence microscopy together with the advances of genetical and biochemical investigations has considerably improved our understanding of cellular organization. Studies performed in different bacterial models have

revealed how cell morphology is controlled by cytoskeletal structures and how cell division is spatially orchestrated and coordinated within the cell cycle (for review see Shapiro *et al*, 2009). In *Escherichia coli*, cell division involves septation at mid-cell. The divisome consists of a complex machinery (> 10 proteins) assembled around the FtsZ ring that is used as a scaffold (Adams and Errington, 2009). The assembly of the FtsZ ring is a key step of the cell cycle targeted by several systems that monitor the integrity and segregation of the chromosome. One of these processes, called nucleoid occlusion (Woldringh *et al*, 1991; Wu and Errington, 2004; Bernhardt and de Boer, 2005), inhibits FtsZ ring assembly if a certain level of chromosome segregation is not achieved (Cho *et al*, 2011; Tonthat *et al*, 2011). The accurate distribution of the sister chromatids into each daughter cell imposes a necessary synchronization of chromosome segregation and division processes. Because of the control of cell division and chromosome segregation, optimal nucleoid folding is essential to avoid interference with division ring assembly (Sawitzke and Austin, 2000).

Nucleoid folding and compaction relies on several processes: unrestrained DNA supercoiling, formation of a chromatin-like structure through the interaction of nucleoid-associated proteins with DNA, DNA condensation by structural maintenance of chromosome (SMC)-like proteins, and macromolecular crowding (Thanbichler *et al*, 2005). Because replichores tend to be localized into distinct compartments of cell, it is proposed that *E. coli* chromosome presents a transversal subcellular organization (Nielsen *et al*, 2006; Wang *et al*, 2006). This replichore localization bias is generated by the non-random segregation of the leading and lagging strands, respectively, towards the old and the new pole of the cell (White *et al*, 2008). The chromosome is organized into large regions called macrodomains (MDs) and non-structured (NS) regions (Niki *et al*, 2000; Valens *et al*, 2004). MDs have been defined as large regions in which DNA interactions occurred preferentially and DNA interactions between the different MDs are highly restricted; in NS regions, DNA sites can interact with both flanking MDs (Valens *et al*, 2004). The *E. coli* chromosome contains four MDs: the Ori MD contains *oriC* while the opposite Ter MD contains the replication terminus and the chromosome dimer resolution *dif* site. The Ter MD is flanked by the left and right MDs, whereas the Ori MD is flanked by the two NS (NS^{Right} and NS^{Left}) regions. Each MD occupies a specific territory inside the nucleoid and is segregated with specific properties (Espeli *et al*, 2008). The binding of the MatP protein to 23 *matS* sites distributed in the 800-kb Ter region promotes the structuring of the Ter MD; this interaction provokes the condensation of the Ter region in a small territory. The MatP focus forms the centre of the Ter MD territory. The binding of MatP to *matS* sites constrains DNA mobility of markers in the Ter region. Inactivation of MatP results in severe segregation defects at fast growth rates; anucleated

*Corresponding authors. O Espéli or F Boccard, Centre de Génétique Moléculaire du CNRS (UPR3404), Associé à l'Université Paris-Sud, Gif-sur-Yvette 91198, France. Tel.: +33 169823214; Fax: +33 169823160; E-mail: espeli@cgm.cnrs-gif.fr or Tel.: +33 169823220; Fax: +33 169823160; boccard@cgm.cnrs-gif.fr

¹Present address: Chromosome Dynamics Group, Centre de Génétique Moléculaire du CNRS, Associé à l'Université Paris-Sud, 91198 Gif-sur-Yvette, France

²Present address: Laboratoire de Chimie Bactérienne CNRS, 13009 Marseille, France

³Present address: Centre for Bacterial Cell Biology, University of Newcastle upon Tyne, Newcastle upon Tyne NE2 4AX, UK

Received: 10 November 2011; accepted: 12 April 2012

and filamentous cells with unsegregated nucleoids are observed. As a consequence of the chromosome segregation defects noticed in the *matP* mutants, alterations of the division process are observed (Mercier *et al*, 2008).

The understanding of bacterial chromosome segregation has improved considerably in recent years. In several species, *parABS* partition systems are involved in driving the segregation process (reviewed by Possoz *et al*, 2012). In *E. coli*, no such mitotic apparatus has been identified and several proposals have been put forth, among them extrusion of the DNA by the replication machinery, *migS*-driven segregation or entropic exclusion of sister chromosomes (reviewed by Toro and Shapiro, 2010). In *Bacillus subtilis*, the replication itself has been proposed to contribute to the segregation process. In the capture extrusion model, a static replication machinery (called the DNA factory) is involved in the capture of chromosomes at mid-cell for replication; thereafter, newly replicated sister chromatids would be segregated into the future daughter cells (Lemon and Grossman, 2001). The recent observations in *E. coli* that replisomes are actually mobile in the cell suggested that the replication machinery followed the chromosome rather than constraining its localization (Bates and Kleckner, 2005; Reyes-Lamothe *et al*, 2008a). This observation made the capture extrusion model less likely in *E. coli*.

The segregation of the Ter region of the *E. coli* chromosome has been described in several studies. The frequent localization of any FROS tagging the Ter MD or of the MatP focus at mid-cell has been repeatedly observed (Li *et al*, 2002; Bates and Kleckner, 2005; Adachi *et al*, 2008; Espéli *et al*, 2008; Mercier *et al*, 2008). The localization pattern of the Ter MD is lost in the absence of MatP (Mercier *et al*, 2008). The choreography of the Ter MD in the *E. coli* wt strain is tightly controlled and includes three steps: (i) migration from the pole to the mid-cell in the new-born cells; (ii) a prolonged localization at mid-cell and finally (iii) duplication of the sister Ter MD foci around mid-cell a short time before septation.

In this study, we analysed the role played by the division apparatus and the replication machinery in the segregation of the Ter region. Simultaneous observation of the assembly of the septation ring and migration of MatP, allowed us to analyse how MatP interacts with cellular components at mid-cell. A new assay indicated the extended localization of MatP at mid-cell, and tests of the implication of divisome proteins in this localization revealed that MatP interacts

directly with the early septal protein ZapB. The anchoring of MatP to ZapB contributes to the maintenance of the Ter MD in a condensed territory. By using a strain carrying a linearized chromosome with the Ter MD split in two parts (Cui *et al*, 2007), we have shown that MatP associated to ZapB can hold together the two halves of the Ter MD even if they are physically separated. Finally, we have shown that MatP is not responsible for the migration of the Ter MD from the pole to the mid-cell. Instead, we present strong evidence that Ter DNA is recruited to mid-cell during the process of replication with replisomes localized at mid-cell.

Results

Localization pattern of MatP

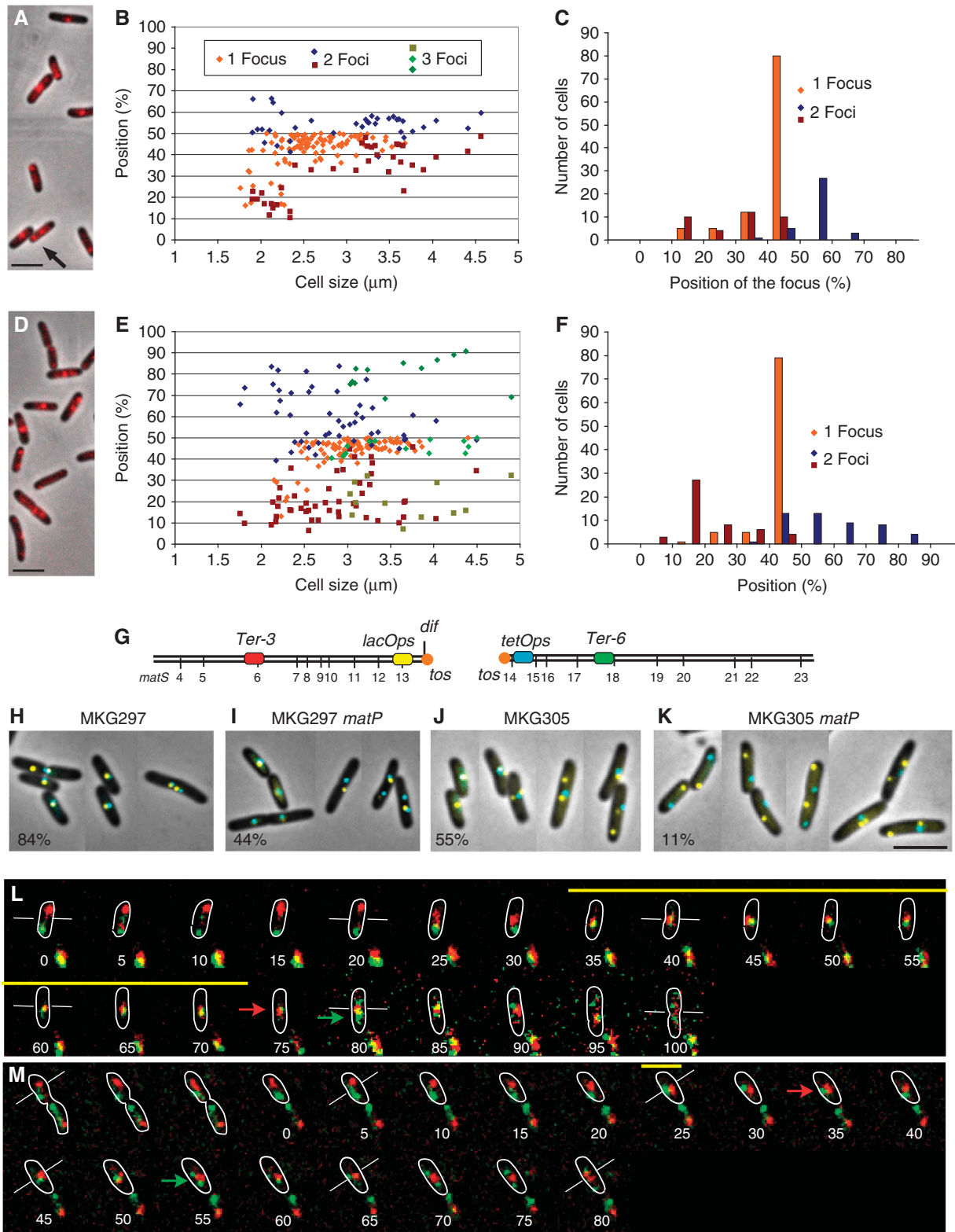
We previously reported that, during a persistent step of the cell cycle, the Ter MD is observed at mid-cell (Espéli *et al*, 2008). Time-lapse experiments revealed that during a cell cycle with overlapping replication and division, new-born cells presented one MatP focus localized near the new pole and, as cells progressed in the cell cycle, the MatP focus was found to mid-cell where it remained for a long period. A few minutes before division, the MatP focus duplicates into two and the two sister foci remain juxtaposed for a few minutes before moving away from mid-cell (Mercier *et al*, 2008). We have constructed a MatP-mCherry in order to refine this pattern of localization (Figure 1A–C). As observed previously for MatP-GFP, every cell presented at least one MatP focus; new-born cells displayed one MatP-mCherry focus near the pole of the cell, larger cells presented one MatP-mCherry focus localized at mid-cell, and two separated foci were observed in the largest cells before division (Figure 1A–C). About 80% of the cells presented one MatP focus at mid-cell (Figure 1C), confirming that the Ter MD remains localized at mid-cell for a large part of the cell cycle. Because of a greater signal-to-noise ratio for the MatP-mCherry fusion compared with the MatP-GFP, we were able to observe a significant number (≈ 5 –8% of the population) of small cells with two MatP-mCherry foci. This corresponds to cells presenting one focus near the pole and one focus near mid-cell. Usually the two foci were not of equal intensity (Figure 1A, arrow; Supplementary Figure S1). We measured the fluorescence intensity in each focus in 26 cells and observed an inverse relationship between the amount of fluorescence in the polar foci and the central foci (Supplementary Figure S1).

Figure 1 MatP holds the Ter MD at mid-cell. (A) Merged picture of MatP-mCherry (red) and phase-contrast micrographs (grey) of MG1655 cells with a circular chromosome. (B) Histogram of the relative positions from the pole of the cell of MatP-mCherry foci observed in (A) according to cell size. Cells with one focus or two foci are indicated. (C) Histogram representing the number of cells with 1, 2 or 3 MatP-mCherry foci observed in (A) according to the position of the focus. (D) Merge of MatP-mCherry (red) and phase-contrast micrographs (grey) in MG59 cells with a linearized chromosome. Cells with one focus or two foci are indicated. (E) Histogram of the relative positions from the pole of the cell of the MatP-mCherry foci according to cell size. (F) Histogram representing the number of cells with 1, 2 or 3 MatP-mCherry foci according to the position of the focus. (G) Map of the Ter MD with the position of the *matS* sites and the FROS tags used in the following panels. (H–K) localization of the lacOps and tetOps FROS tags in strains with circular or linear chromosome. (H) wt MKG297 strain. (I) MKG297*matP*. (J) MKG305 linear chromosome. (K) MKG305*matP*. The percentage of cells presenting at least one lacOps and one tetOps colocalized at mid-cell is indicated. (L) Merged pictures of a time-lapse experiment with 5 min intervals for the segregation of the Ter-3 (red) and Ter-6 (green) loci in strain MG59 (linear chromosome). Because photobleaching grey levels in the montage were not homogeneously set, starting at the time point 75 min a narrow grey scale was used for both fluorescence channels. The yellow bar represents the extent of colocalization of the red and green foci, the white bars tag the mid-cell for specific stages, the red and green arrows represent, respectively, the duplication of the Ter-3 and Ter-6 focus. Outlines of the cells were drawn according to phase-contrast images. The red and green foci at the bottom of each image correspond to foci from adjacent cells. (M) Merged pictures of a time-lapse experiment with 5 min intervals for the segregation of the Ter-3 (red) and Ter-6 (green) loci in strain MG59*matP* (linear chromosome). Same representation as in (L). Scale bars represent 3 μ m.

MatP is required to maintain the Ter MD at mid-cell

To evaluate the potential of MatP to organize and target the Ter MD at mid-cell, we analysed its ability to gather the two separated halves of the Ter MD split apart. To do this, we used a strain where the Ter region was split into two parts by linearization in the middle of the chromosome near the dimer resolution *dif* site. This strain was constructed using the

linearization module of the N15 prophage (Cui *et al*, 2007). MatP-mCherry formed foci in the cells with a linear chromosome (Figure 1D-F). The new-born cells frequently displayed two foci close to each pole and larger cells presented one focus at mid-cell. More than 60% of the cells displayed a single MatP-mCherry focus at mid-cell. The central MatP-mCherry was sometimes flanked by one or two polar foci.



Altogether, these results suggested that the two halves of the Ter MDs merged at mid-cell at a defined step of the cell cycle, mostly in cells of median size (Figure 1C). To rule out the possibility that MatP–mCherry would only tag one of the chromosome ends, we used FROS tags (*lacO* and *tetO*) (Lau *et al*, 2003) to simultaneously observe both ends of the linear chromosome (Figure 1G–K; Supplementary Figure S2). We observed a frequent colocalization of lacOps and tetOps at mid-cell in wt cells with a circular chromosome (84%), in *matP* cells with a circular chromosome (44%) and in wt cells with a linear chromosome (55%). However, in the absence of MatP only a small percentage of cells with a linear chromosome (11%) presented a mid-cell colocalization of both operators. These results revealed that MatP has the ability to maintain together the two separated halves of the Ter MD.

To follow the dynamics of chromosomal tags inserted in the Ter region of a linear chromosome in the presence and absence of MatP, we performed time-lapse experiment using *parS*/ParB–P1 (*parS^{P1}*) and *parS*/ParB–pMT1 (*parS^{pMT1}*) FROS (Nielsen *et al*, 2006). *E. coli* grown in minimal medium supplemented with casamino acids and glucose is characterized by overlapping replication and division cycles (Espéli *et al*, 2008). Time-lapse experiments were performed over a complete cell cycle (120 min) as described before (Espéli *et al*, 2008; Mercier *et al*, 2008). The Ter-3 (*parS^{P1}*) and Ter-6 (*parS^{pMT1}*) tags were inserted 200 kb from the *tos* site on each chromosome arm of a linear chromosome (Figure 1G). The montage presented in Figure 1L and M and Supplementary Figure S3 are representative of the population observed. In the new-born *matP*+ cells (Figure 1L), one red (Ter-3) and one green (Ter-6) focus were distant and localized close to each pole. About 30 min after birth, the foci moved to mid-cell, where they remained colocalized for 40–50 min. After this colocalization period, each focus duplicated, and the colocalization of the chromosome ends did not persist. In the absence of MatP (Figure 1M), the first part of the cell cycle was similar to that observed in MatP+ cells. The tagged chromosome arms were localized to distinct cell halves in the new-born cells. As in the wt cells, ~30 min after birth, both tags moved to mid-cell. However, the two foci rapidly (<10 min of colocalization) separated at mid-cell and were promptly separated from each other (Figure 1M; Supplementary Figure S3). Our results indicated that Ter MD migration to mid-cell is independent of MatP, whereas MatP is required for an extended colocalization of chromosome ends at mid-cell.

The termini regions of linear chromosomes are replicated at mid-cell

The migration of the two ends of the linear chromosome to mid-cell occurs 30–40 min after birth (Figure 1L and M), a period that corresponds to the estimated timing of replication of the loci under consideration (Espéli *et al*, 2008). To analyse more precisely the timing of the Ter MD migration to mid-cell during the cell cycle, we followed the dynamics of the replisomes together with that of chromosomal markers. First, using a *ssb-ypet* fusion, we analysed the dynamics of the replisomes in strains with a circular or a linear chromosome (Figure 2A). In strain with circular chromosome, new-born cells were finishing the replication rounds initiated in the mother cell; they presented two SSB–YPet foci corresponding to the forks that replicated the right and left replichores. Later, the two foci merged at mid-cell.

We assumed that merging corresponded to the replication of the terminus region. After a brief period without replication (cells lacking SSB–YPet focus), the replication was initiated simultaneously on two chromosomes (large cells with two SSB–YPet foci). A few minutes before division, the replication forks separated, giving rise to cells with 4 SSB–YPet foci (Figure 2A; Supplementary Figure S4A). Remarkably, this pattern is maintained with little modification in the cells with a linear chromosome (Figure 2A; Supplementary Figure S4A). Moreover, MatP plays no role in the replisome choreography since similar values were obtained during replication of either circular or a linear chromosome, in both wt and *matP* backgrounds. The most remarkable result was the observation, with a linear or a circular chromosome, of a single SSB–YPet focus near mid-cell at the predicted moment of replication of the two termini (Figure 2A).

Second, we simultaneously followed the dynamics of the replisomes with that of chromosomal Ter markers. We tagged a locus in the terminus region of a linear chromosome (Ter-2 *parS^{P1}*; Figure 2B) in a strain expressing a *ssb-ypet* fusion (Figure 2B–E; Supplementary Figure S4B and C). On a linear chromosome, replication is forced to finish at the *tos* site, ensuring that replication of the Ter-2 site is achieved by the rightward replication fork 250 kb before it ends. As expected, we observed cells with 0, 1, 2 and 4 SSB–YPet foci and cells with 1 or 2 Ter-2 foci (Figure 2C). At the moment of its replication, the Ter-2 locus must be colocalized with an SSB focus (interfocal distance < 100 nm). These events were rare (~3% of the population) and solely observed in the context of cells presenting 1 Ter focus and 1 SSB–YPet focus (Figure 2C and D). Strikingly, none of the cells with two SSB–YPet foci displayed a colocalized Ter-2 focus (Figure 2C and E; Supplementary Figure S4). Colocalized single SSB and Ter-2 foci were found near mid-cell in most cells (around 80%). These observations demonstrated that the replication of the Ter-2 locus and likely that of a large terminus region (Ter-2 is localized 250 kb before *dif*) is achieved at mid-cell for most of the cells with a linear chromosome.

The migration of the Ter MD to mid-cell is coordinated with its replication

The ends of each chromosome's arm of a linear chromosome were brought to mid-cell at the time of their replication. This observation suggests that in cells with a circular chromosome, the merging of the replisome foci in one focus may not solely be the consequence of two forks running in the opposite orientation on a circular track and meeting at the terminus already localized at mid-cell. An alternative hypothesis stipulates that the two replisomes could meet at mid-cell before replicating the Ter MD and therefore could provoke Ter MD migration towards mid-cell for its replication. A consequence of this hypothesis would be that the loci from the terminus region would migrate to mid-cell in sequential order according to their genetic distance from *oriC*. To test this hypothesis, we analysed the dynamic behaviour of different FROS tags inserted in the Ter region. Using a triple-labelled strain with MatP–mCherry, Ter-7 *parS^{pMT1}* (2000 kb from *oriC*) and Ter-6 *parS^{P1}* (2200 kb from *oriC*) tags (Figure 3A), we observed that the Ter-7 tag was localized at mid-cell in the smallest cells, while the Ter-6 and the majority of the MatP–mCherry signals were still near the pole of the cell (Figure 3B,

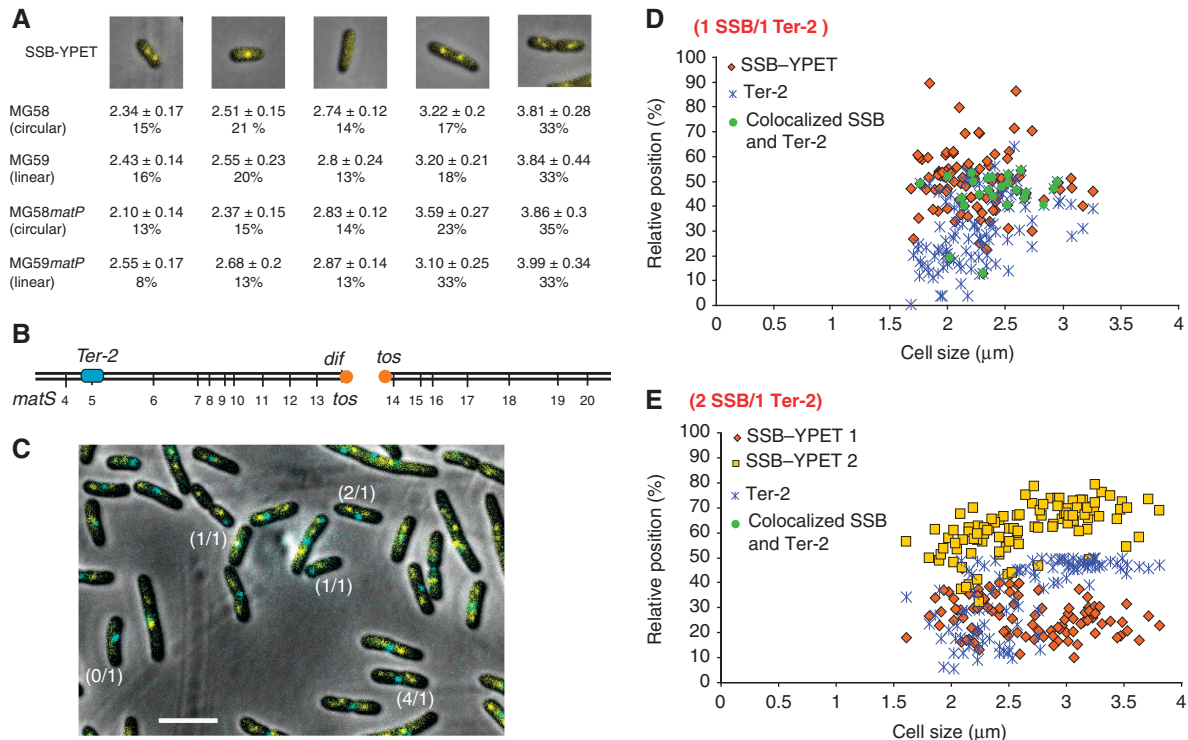


Figure 2 The Ter MD is replicated at mid-cell in strains with circular or linear chromosome. **(A)** Localization of the SSB–YPet fusion in MG58, MG58matP, MG59 and MG59matP strains. Average size (mm) and the percentage of cells in each category are indicated. **(B)** Position of the Ter-2 (*parS^{P1}*) tag inserted in the chromosome of the MG59 strain (MG1655 with a linear chromosome). **(C)** Localization of SSB–Ypet and the of Ter-2 *parS^{P1}* tag in the MG59 cells. Examples of cells with 0 SSB focus and 1 Ter-2 focus (0/1), 1 SSB and 1 Ter-2 (1/1), 2 SSB and 1 Ter-2 (2/1) and 4 SSB and 1 Ter-2 (4/1) are highlighted. The cells were grown to O.D. = 0.2 in liquid medium, spread on agar pads and observed immediately. Scale bar represents 3 μm. **(D)** Histogram of the localization of SSB–YPet and the Ter-2 tag in MG59 cells containing one focus for each. **(E)** Histogram of the localization of SSB–YPet and the Ter-2 tag in MG59 cells containing one focus of Ter-2 and two SSB–Ypet foci. Scale bars represent 3 μm.

picture 1). In larger cells (picture 2), most of the MatP–mCherry signal observed at mid-cell colocalized with Ter-7, while the Ter-6 tag remained at the pole and colocalized with a faint second MatP focus. These two categories of cells (pictures 1 and 2) only represented 4% of the population, suggesting that splitting of the ter MD loci is a transient event during the cell cycle. Later (picture 3) the Ter-6 tag migrated to mid-cell and merged with the Ter-7 tag and MatP–mCherry (60% of the population). In every further step of the cell cycle, at least one Ter-6, one Ter-7 and one MatP focus were colocalized near mid-cell (pictures 4–7). This experiment showed that the Ter MD migrates progressively to mid-cell starting from its *oriC* proximal part. Together with the results showing an inverse relationship between the amount of fluorescence in the polar and central MatP foci (Figure 1; Supplementary Figure S1), these results indicated that the MatP focus does not migrate as a whole from the pole to mid-cell but rather that MatP molecules dissociated progressively from the Ter region at the pole and reassembled at mid-cell after migration of the Ter DNA.

To test directly the influence of replication on the migration of the Ter MD to mid-cell, we analysed a locus from the terminus region (Ter-3 *parS^{P1}*) following replication arrest mediated by the inactivation of the DnaB helicase (Figure 3C). At 42°C, a *dnaB^{ts}* mutation inhibits the progression of DNA replication forks. At 30°C, most MG1655 *dnaBts* cells presented one central Ter-3 focus (Figure 3C and D). After 40 min at 42°C, wt cells presented 1 central focus or 2

foci localized at the mid-cell and quarter positions (Figure 3C). Cells from the *dnaBts* allele, presented mostly one focus near the quarter position (Figure 3C and E) suggesting that in the absence of replication, the Ter-3 migration from the new pole to mid-cell was blocked. To confirm this observation, we chose to block replication at the initiation step with the *dnaCts* allele (Figure 3F). As expected, we observed a strong decrease of the number of cells with a mid-cell localized Ter-7 *parS^{DMT1}* tag following a 1-h initiation block at 40°C (Figure 3F). In contrast from the *dnaBts* block, the *dnaCts* allele did not provoke the accumulation of cells with a focus near the quarter position; this could reflect a different organization of chromosomes frozen during replication compared with fully replicated chromosomes.

We used chromosome rearrangements to test directly the influence of the position on the genetic map on the migration of Ter loci. In the FBGT2 strain where the Ter MD is interrupted by the right MD, that is, a large Ter MD region is present at an ectopic position replicated 600 kb earlier (strain FBGT2 in Supplementary Figure S5A–C). Experiments showed that arrival at mid-cell for a locus in the terminus region (Ter-3 tag) can be observed earlier when it is replicated earlier. Using another strain carrying unbalanced replication arms (Esnault *et al*, 2007), we observed that a delay in the replication of a locus from the terminus region (Ter-3 tag) also delays its timing of migration toward mid-cell (Supplementary Figure S5D and E). Migration to mid-cell of a locus in the terminus region is therefore coordinated with its replication. Altogether, our results

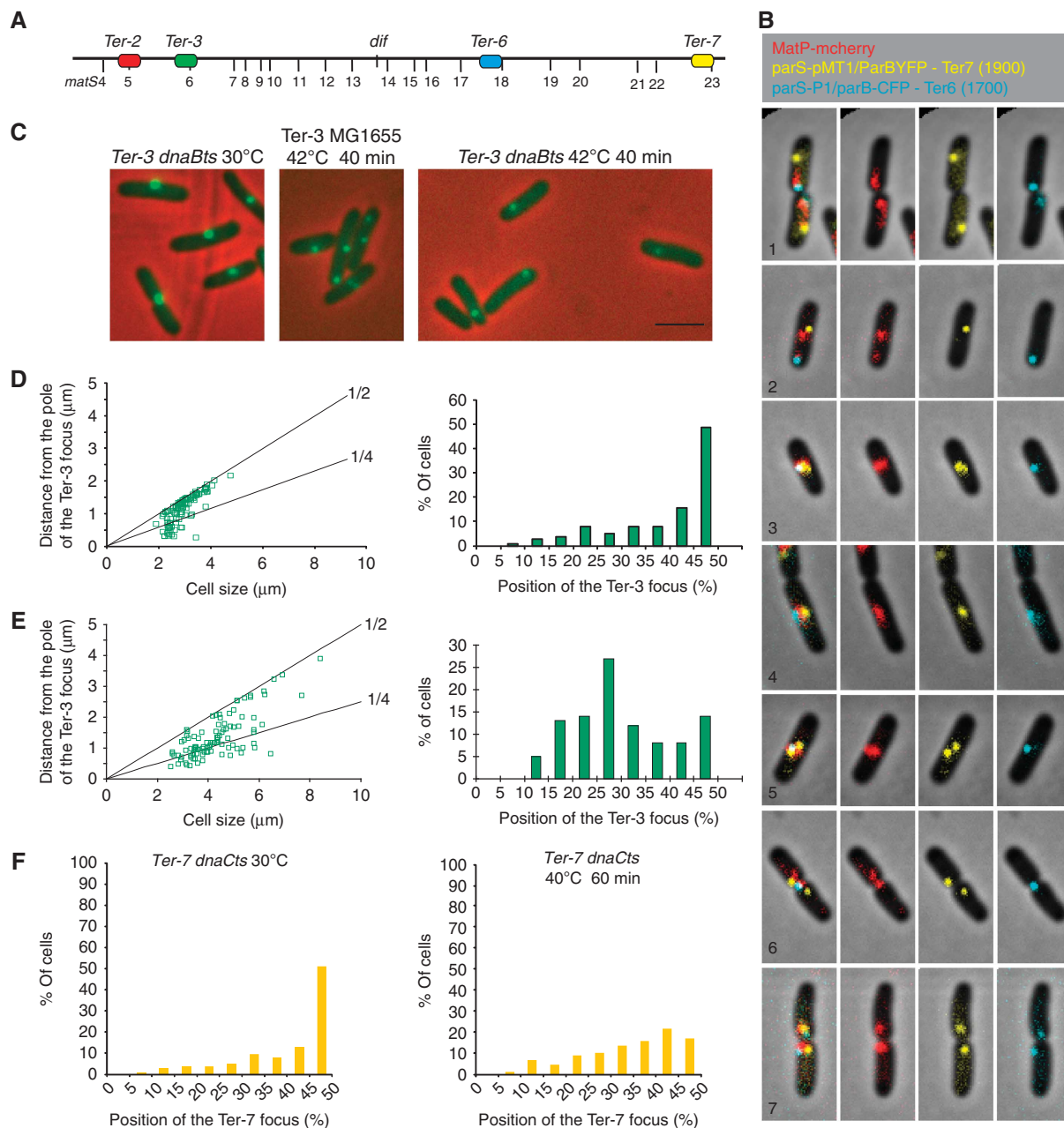


Figure 3 The replication machinery is involved in recruiting the Ter DNA to mid-cell. **(A)** Map of the Ter MD indicating the position of the *matS* sites and the *parS* tags used in the following panels. **(B)** Examples of representative cells tagged with *parS^{pMT1}/ParBYFP* at Ter-7 (yellow), *parS^{P1}/ParBCFP* at Ter-6 (blue) and MatP-mCherry (red). The pictures are arranged from new-born cells (1) to predivisive cells (7) according to cell size. Together, groups 1 and 2 represent 4% of the population, groups 3–5 represent 60% of the population, group 6 represents 20% and group 7 represents 11% of the population. The left panel is a montage of the merge pictures presented in the right panels. **(C)** Localization of the Ter-3 *parS^{P1}* tag in MG1655 and MG1655 *dnaBts* cells during a 30–42°C shift. Scale bar represents 3 μm. **(D)** Histogram of the position of the Ter-3 focus in MG1655 *dnaBts* cells according to cell size at 30°C (Left). Only cells with one focus were included. Histogram of the percentage of MG1655 *dnaBts* cells present in each category defined by the Ter-3 focus position at 30°C (Right). **(E)** Histogram of the position of the Ter-3 focus in MG1655 *dnaBts* cells according to cell size at 42°C (Left). Only cells with one focus were included. Histogram of the percentage of MG1655 *dnaBts* cells present in each category defined by the Ter-3 focus position at 42°C (Right). **(F)** Histograms of the percentage of MG1655 *dnaCts* cells present in each category defined by the Ter-3 focus position at 30°C or after 60 min at 40°C.

(Figures 1–3; Supplementary Figures S3–S5) showed that replication has direct consequences on the subcellular positioning of the terminus region during the cell cycle.

Anchoring of the Ter MD to the septal ring

We observed that the Ter MD is maintained at mid-cell for a long time (Figures 1A, L and 3B) following its replication

(Figure 2E) in a MatP-dependent manner (Figure 1L and M). To determine whether the division apparatus that assembles at mid-cell is involved in the precise localization of MatP and of the Ter region, we analysed more precisely the assembly of the septal ring and the migration of MatP to mid-cell. The septal ring is formed of several proteins that assemble progressively at mid-cell around the tubulin-like polymer of

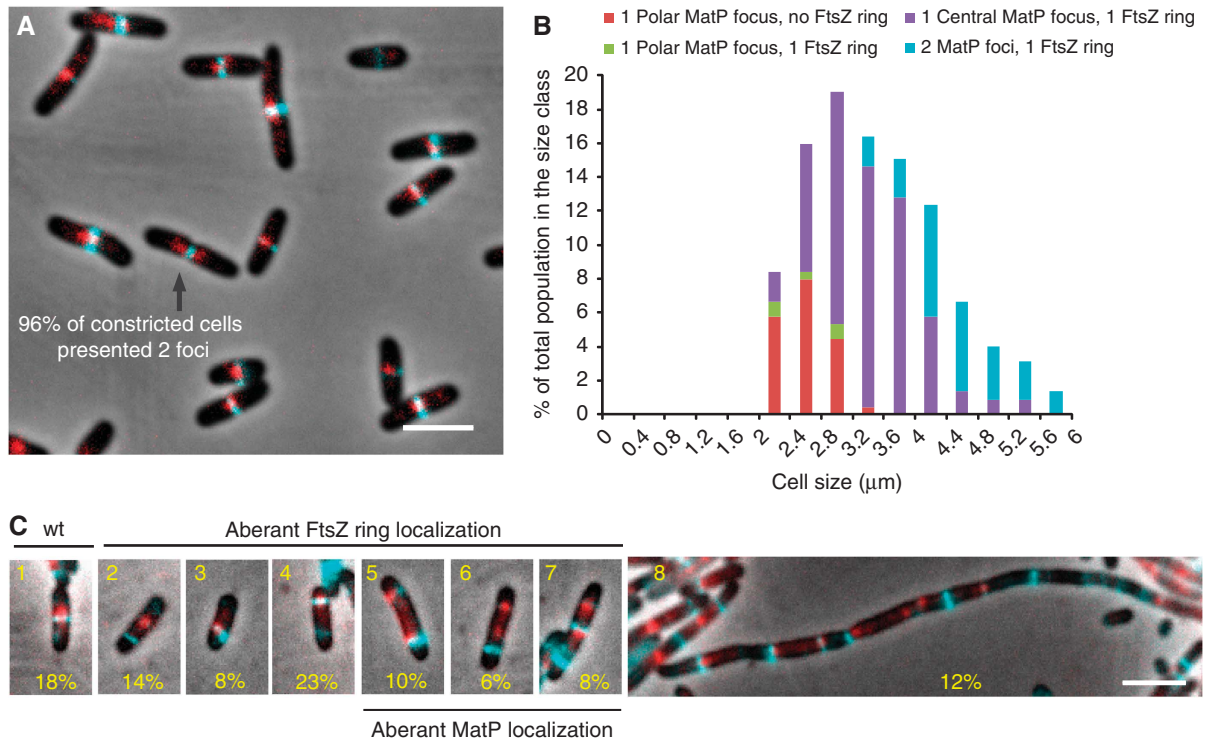


Figure 4 MatP is colocalized with the septal ring. **(A)** Merged pictures of MatP-mCherry (red), FtsZ-CFP (cyan) and phase-contrast micrographs (grey) of the MG1655 cells grown in minimal medium supplemented with casamino acids and glucose. **(B)** Histograms representing the appearance of the FtsZ ring and the positioning of MatP-mCherry near the pole (distance from the pole <30% of the cell size) or at mid-cell (position of the focus comprised between 45 and 50% of the cell size) according to the cell size. **(C)** Merged picture of cells expressing MatP-mCherry (red) and FtsZ-CFP (cyan) with phase-contrast microscopy (grey), grown under FtsZ-CFP overexpression conditions. Eight categories of cells were defined; the percentage of cells in each category is indicated. Scale bars represent 3 μm.

FtsZ (Adams and Errington, 2009). MatP-mCherry and FtsZ-CFP fusions were constructed (Figure 4A). A snapshot analysis of MatP-FtsZ colocalization was performed with a strain expressing simultaneously MatP-mCherry and FtsZ-CFP fusions. As expected, FtsZ-CFP formed a mid-cell ring in the majority of cells. Only the smallest cells failed to present a distinct Z ring (Figure 4A and B). MatP-mCherry foci were present in every cell. They were frequently found under the FtsZ ring. Interestingly, MatP followed FtsZ dynamics, that is, small cells without an FtsZ ring presented a MatP focus near the pole, cells with a mid-cell MatP focus always presented a colocalized FtsZ ring and the largest cells presented two MatP foci flanking the FtsZ ring (Figure 4B). We noticed that the duplication of the MatP focus into two adjacent foci is concomitant with septum constriction; that is, 96% of cells with a distinct septum displayed two MatP-mCherry foci. MatP also frequently colocalized with the FtsZ ring in a strain with a linear chromosome (Supplementary Figure S6). Because simultaneous localization of MatP-mCherry and FtsZ-CFP could rely on independent but synchronous processes, we altered the amount of FtsZ polymers in the cell by over expressing FtsZ-CFP (Figure 4C). The over expression provoked the accumulation of heterogeneous and mislocalized FtsZ-CFP signals. We distinguished eight categories of cells that testify to the profound alteration of cell physiology observed in this context. Only a small percentage of the cells have a wt pattern (category 1, 18% of the population). MatP foci were frequently observed to be colocalized with aberrant FtsZ rings (categories 3, 4, 5 and 7). Aberrant MatP localization can also be observed without FtsZ colocalization (category 6 and category 8 (fila-

ments)). Overall, these experiments indicate that the division machinery can be targeted by MatP and that FtsZ is not the only determinant controlling this process.

ZapB is the target of MatP at mid-cell

To identify the factors involved in anchoring of MatP to mid-cell, it was necessary to develop an assay capable of directly revealing this association. We anticipated that MatP could anchor *matS*-containing DNA to mid-cell. We therefore used a reporter plasmid containing a *parS*^{PMT1} and 2 *matS* sites. A dynamic diffused signal was detected using the control plasmid devoid of a *matS* site, indicating random distribution of the plasmids moving rapidly in the cellular space (Figure 5A; Supplementary Figure S7A). In contrast, when *matS* sites were present on the plasmid, a very distinct pattern of localization was observed. Plasmids with *matS* sites accumulated at mid-cell in a very bright and stable ring-like structure (Figure 5A; Supplementary Figure S7B). The ring-like structure is also observed in strains with different genetic backgrounds than MG1655 such as AB1157 (Supplementary Figure S7C). The *matS* plasmid localization to mid-cell is dependent on MatP since no accumulation of fluorescence was detected at mid-cell in *matP* cells (Supplementary Figure S7D). Using a strain containing the *matS* plasmid and expressing MatP-mCherry, MatP was simultaneously found associated to these ring-like structures (Figure 5B). Remarkably, in this context, most MatP-mCherry formed ring-like structures rather than foci (compare Figures 1A, 3B and 4A with 5B).

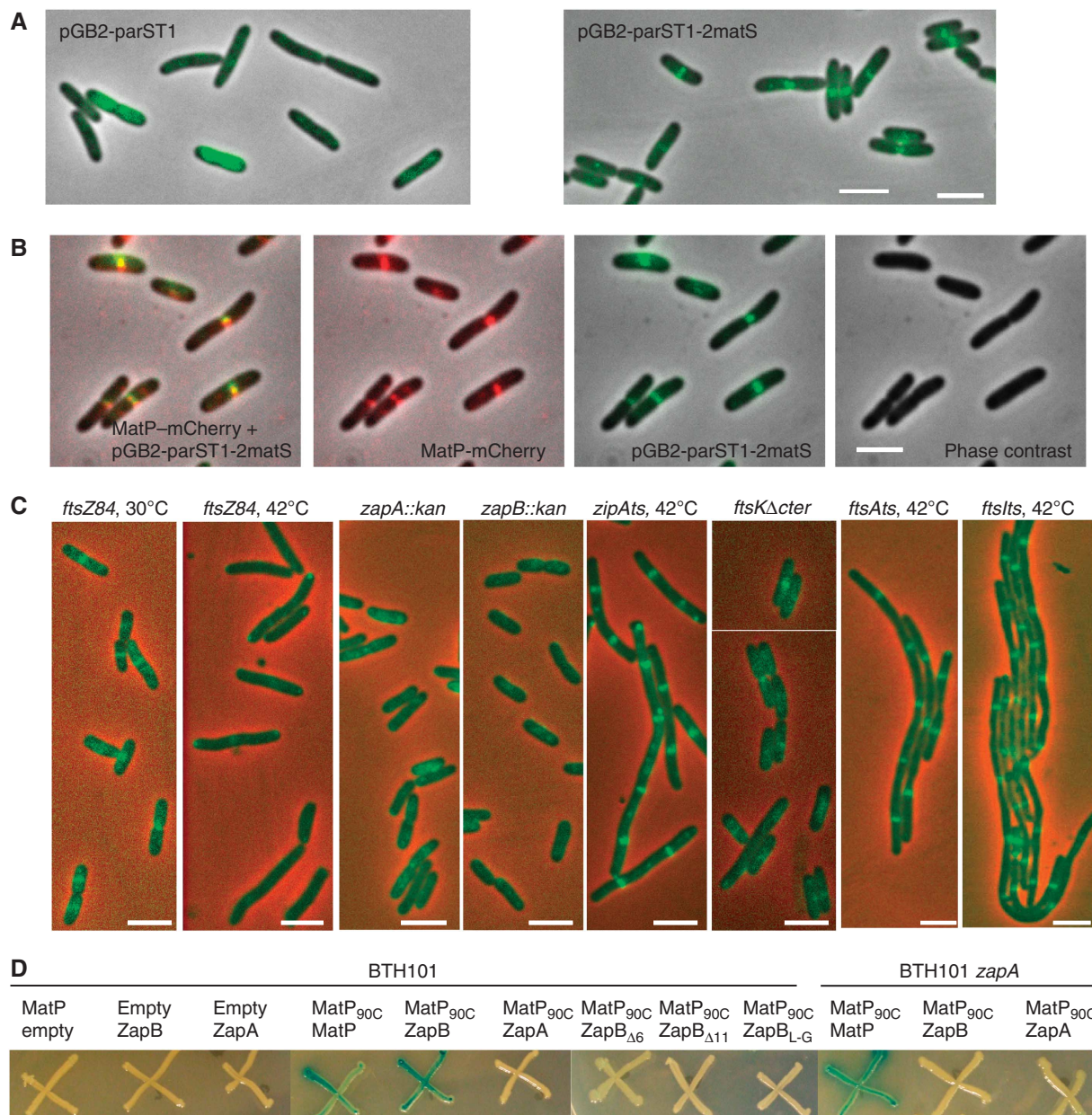


Figure 5 MatP interacts with ZapB. **(A)** Merged pictures of the pGB par^{T1} or the pGB par^{T1} -2matS plasmid (green) and phase-contrast micrographs (grey) in MG1655 cells. **(B)** Montage of merged pictures of the MG1655matP-mCherry strain containing the pGB par^{T1} -2matS plasmid. pGB par^{T1} -2matS (green), MatP-mCherry (red) and phase-contrast microscopy (grey) are shown. **(C)** Localization of the pGB par^{T1} -2matS plasmid (green) in MG1655*ftsZ84*, *zapA*, *zapB*, *ftsKΔC* strains grown at 30°C and the MG1655*ftsZ84*, *zipA*, *ftsA*, *ftsI* strains grown at 42°C for 1 h. Scale bars represent 3 μm. **(D)** Bacterial two-hybrid assay; the BTH101 and BTH101*zapA* strains containing the pKT25, pKT25MatP, pKT25ZapA, pKT25ZapB, pKT25ZapB_{Δ6}, pKT25ZapB_{Δ11} or pKT25ZapB_{L-G} and pUT18c or pUT18CMatP_{90C} plasmids were grown in LB supplemented with kanamycin, ampicillin, IPTG and Xgal at 30°C; pictures were taken after 2 days of incubation at 30°C.

We took advantage of the robust signal of the system described above to survey the involvement of various septal ring proteins in MatP-dependent anchoring to mid-cell of plasmids carrying *matS* sites. The septal ring is composed of multiple proteins, both essential and accessory, which localize to the septum. To probe for the involvement of these different proteins, we tested the accumulation of the reporter *matS* plasmid in deletion (*zapA*, *zapB*, *ftsKΔC*) or thermo sensitive (*ftsZ*, *zipA*, *ftsA*, *ftsI*) mutants. At non-permissive temperatures, regularly spaced bands of the *matS* plasmids were observed in the filaments after inhibition of *ftsI*, *zipA*, *ftsA*, or deletion of 3' end of *ftsK*. In contrast,

inhibition of *ftsZ* and the deletion of *zapA* and *zapB* genes profoundly altered the band pattern (Figure 5C; Supplementary Figure S7E). Because ZapA and ZapB septal ring associations are dependent on FtsZ, and nearly normal FtsZ rings are produced in *zapA* or *zapB* mutants, it is likely that FtsZ is not the direct target of MatP. The ZapA and ZapB proteins have been shown to stabilize FtsZ rings (Gueiros-Filho and Losick, 2002; Ebersbach *et al*, 2008). It was demonstrated that ZapA interacts directly with FtsZ, while ZapB requires ZapA to associate with the septum (Galli and Gerdes, 2010). Direct evidence for a ZapB-MatP interaction was obtained by a bacterial two-hybrid assay (Figure 5D).

ZapB interacts strongly with the C-terminus half of MatP (Figure 5D). No interaction between ZapA and MatP was detected by the two-hybrid assay, indicating that ZapB is the main target of MatP among the candidates tested above. Interestingly, the interaction between MatP and ZapB, revealed by the two-hybrid assay, is abolished in the absence of ZapA (Figure 5D), suggesting that MatP and ZapB only interact when ZapB is attached to the septal ring. The interaction of ZapB with ZapA requires the N-terminal end of ZapB but not its C-terminal end (Galli and Gerdes, 2012). Remarkably, ZapB did not interact with MatP after deletion or alteration of its C-terminal domain (Figure 5D) confirming the specificity of the ZapB–MatP interaction.

ZapA and ZapB are required for the mid-cell anchoring of MatP

As expected, MatP–mCherry was perfectly colocalized with ZapB–GFP (Figure 6A) or ZapA–GFP (Figure 6B). As reported previously (Galli and Gerdes, 2010), the absence of ZapB did not alter the localization of ZapA–GFP, confirming that ZapA did not require ZapB for proper anchoring to the septal ring (Figure 6C). In a *zapB* mutant strain, about half of the cells displayed two MatP–mCherry foci that were distant from the ZapA–GFP ring (Figure 6C–E; Supplementary Figure S8), confirming that a ZapA was not the target of MatP and was not sufficient to promote accumulation of MatP at mid-cell. The absence of ZapA profoundly altered the localization of ZapB–GFP and MatP–mCherry (Figure 6F). ZapB–GFP formed bright polar foci that could reflect an aggregation of the protein (Galli and Gerdes, 2010). MatP foci were not colocalized with the ZapB–GFP foci. Moreover, in this context, MatP foci presented a localization pattern similar to that observed in the *zapB* mutant (Figure 6D and E; Supplementary Figure S8). This is in agreement with the two-hybrid experiments, indicating that ZapA is required for the MatP–ZapB interaction. Altogether, these results indicated that MatP interacts with ZapB when associated in a larger complex comprising at least ZapB, ZapA and FtsZ.

Deletion of *zapB* alters the segregation of the Ter MD

To analyse the effect of the ZapB inactivation on the segregation of the Ter MD, we monitored the localization of either MatP–mCherry foci in *zapB* and *zapA* mutants. The localization pattern of MatP–mCherry was altered in the absence of ZapB (Figure 6D and E) compared with the wild-type strain (Figure 1B and C). A larger number of cells with two MatP–mCherry foci were observed whatever the cell size, and a broader distribution of the MatP foci was observed. Also, a significant number of cells displayed three or four MatP–mCherry foci. Similar alterations of the MatP pattern were observed in the *zapA* mutant. The pattern of segregation of the Ter-6 *parS^{DMT1}* tag (Figure 6G and H) was also altered in the absence of ZapB. The Ter-6 focus duplicated earlier and segregated in a less precise manner than observed in the wt cells (Espéli *et al*, 2008). The global pattern of localization of the Ter-6 tag was also altered in the absence of ZapB (Supplementary Figure S9) compared with wt; more cells with two foci were detected (11 and 35% in the wt and the *zapB* mutant, respectively). Further, the youngest cells with two foci were smaller than in wt (2.2 μm in the *zapB* strain compared with 3.5 μm in the wt), and the localization appeared to be less precise. Altogether, these observations

suggest that MatP and ZapB are required for the prolonged localization of the Ter MD at mid-cell. Since the chromosome replication programme was not significantly altered in the absence of ZapB (data not shown), this indicates that sister Ter MD colocalization at mid-cell is reduced in the absence of ZapB.

Deletion of *zapB* does not influence the condensation of the Ter MD

The absence of ZapB did not alter the colocalization of MatP with any *parS* tag tested in the terminus region (Supplementary Figure S9C), showing that MatP remained associated with the *matS* sites in the absence of ZapB. MatP inactivation affected the condensation of the Ter region (interfocal distance increased) (Mercier *et al*, 2008). To determine whether the association of the Ter region with the septal ring was responsible for the condensation of the region, we measured interfocal distances between two tags of the Ter MD separated by 255 kb in *zapB* mutant cells. As previously observed (Mercier *et al*, 2008), the interfocal distance increased in the absence of *matP*. In contrast, the absence of ZapB did not provoke an increase in the interfocal distance (Figure 6I). This observation suggested that the ZapB-mediated anchoring of the newly replicated Ter MDs to the septal ring has no measurable effect on the condensation *per se* of the Ter MD.

Nucleoid segregation is dramatically altered in the *matP zapA* or *matP zapB* strains

We constructed double-deletion mutants for *matP* and *zapA* or *zapB*. On LB agar plates, the colonies were small and heterogeneous in size. Nevertheless, growth in rich medium was possible, allowing microscopic observation of the nucleoid following DAPI staining (Figure 6J–N). Both *matP-zapA* and *matP-zapB* double mutants displayed many filamentous cells with unsegregated nucleoids and anucleated cells. Respectively, 48 and 54% of the cells were abnormal in the *matP-zapA* and the *matP-zapB* strains. The combination of deletions had synergistic effects because in the *matP* deletion strain, no more than 20% of the cells were abnormal, and in the *zapA* or *zapB* deletion strains, <4% of the cells were filamentous, and none displayed major nucleoid segregation defects. The synergistic effects observed with the absence of ZapA or ZapB and MatP suggest that each protein may have a yet uncharacterized function that is only revealed in the absence of its partner (see Discussion).

Discussion

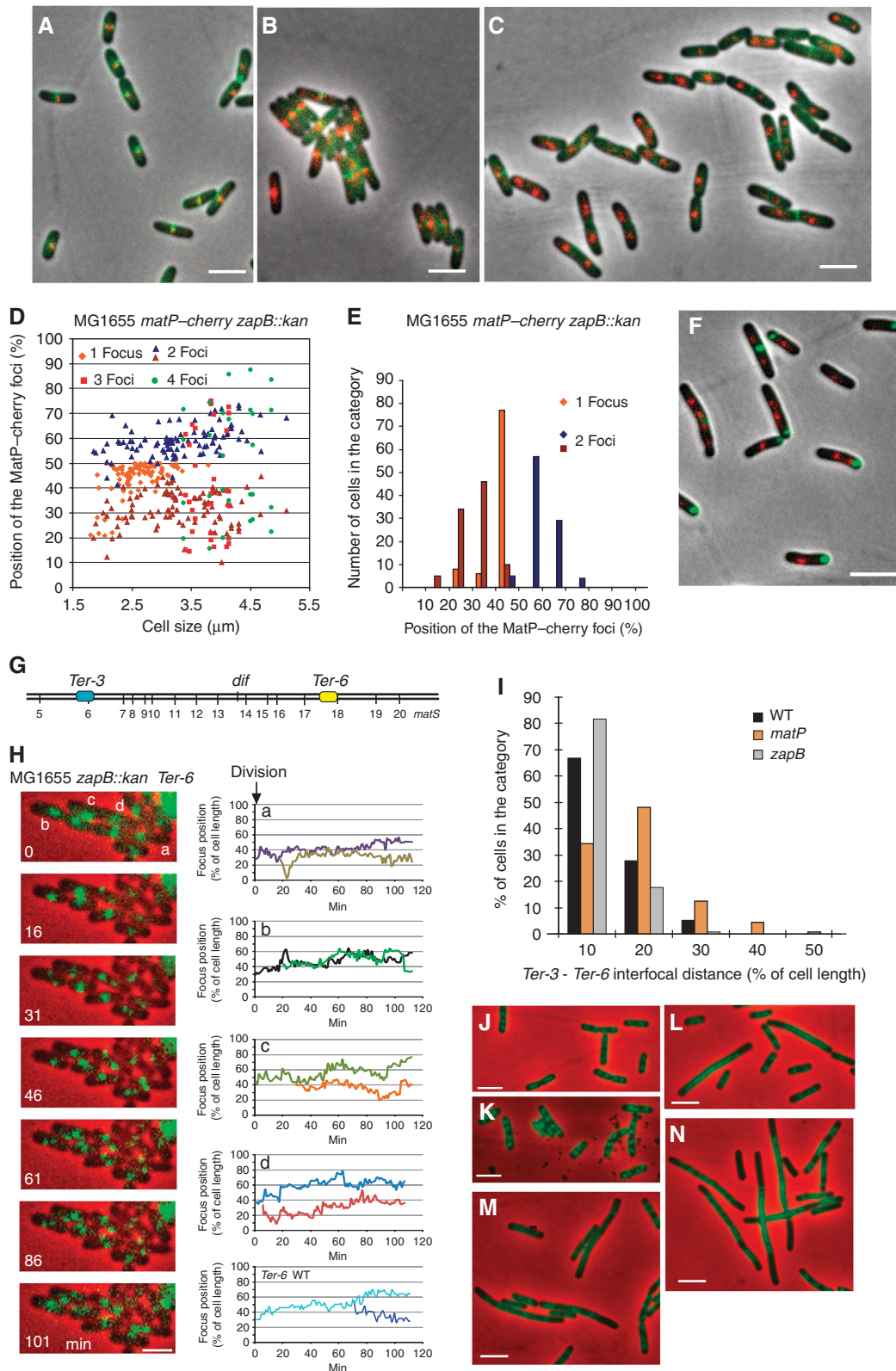
The organization of the Ter MD relies on the site-specific binding protein MatP. Interaction of MatP with *matS* sites affects several observable parameters, that is, mobility constraint of DNA markers, colocalization of sister markers, DNA condensation inside the Ter MD, anchoring of the Ter MD to mid-cell (Mercier *et al*, 2008). Here, we analysed the role of MatP in two different steps of the Ter MD choreography: (i) the migration of the terminus region from the pole to mid-cell and (ii) the prolonged step of mid-cell localization of the Ter MD. We demonstrated that replication of the Ter MD by a centrally localized replisome is coordinated with its migration to mid-cell where the MatP–ZapB interaction stabilized the association of the Ter MD sister chromatids with the septal

ring (Figure 7). MatP and ZapB are thus essential for the Ter MD choreography during the cell cycle.

The migration of the Ter MD to mid-cell is coordinated with its replication

Migration towards mid-cell of the loci of the Ter MD in a circular or a linear chromosome was independent of MatP.

Nonetheless, it was temporally controlled. We demonstrated that migration to mid-cell was initiated by the *oriC* proximal part of the Ter MD and progressed gradually until the migration of the distal loci occurred. This correlated with a progressive disappearance of the polar MatP focus and the reciprocal appearance of a mid-cell focus after migration of the Ter DNA. Ter DNA migration preceded its colocalization



with the SSB-YPet focus and likely its replication. As observed for the circular chromosome, a centrally localized replication factory performed the replication of the Ter region in the context of the linear chromosome. This observation does not support a model proposing that replisomes progress only on the chromosome as trains on a track. Together with previous studies reporting the choreography of replisomes in *E. coli* cells (Reyes-Lamothe *et al*, 2008b), our results are consistent with a model in which the replisomes assemble at *oriC*, then separate to replicate left and right portions of the chromosome and are finally brought together, independently of the circular or linear chromosome configuration, for the completion of the replication process of the Ter region. This model requires that replisome choreography is directed by a different superstructure than the chromosome itself; this superstructure remains to be characterized. A consequence of this replisome choreography is a revival, in *E. coli*, of the capture part of the ‘capture and extrusion model’ (Lemon and Grossman, 2001). We attempted to directly test this capture step of the Ter MD mid-cell by the replication factory in three ways. We have provided evidence suggesting that delay of replication from the Ter MD induces a delay in its migration towards mid-cell, and reciprocally, that an earlier replication induces earlier migration. Finally, we have shown that following a replication blockage, the position of the Ter MD to mid-cell was lost. These elements indicate that sequential migration of the loci from the Ter MD to mid-cell is coordinated with their replication and likely involves their recruitment by the replication machinery. Alternatively, it was proposed that newly replicated sister regions might push one another apart, thus bringing unreplicated regions to mid-cell (Bates and Kleckner, 2005); such process could participate in the migration of the Ter MD to the vicinity of a mid-cell localized replication factory.

An interaction between MatP and the septal ring mediates the anchoring of the sister chromatids at mid-cell by their Ter MD

Sister chromatid colocalization for extensive periods of time has been observed in *E. coli* in several studies (Bates and Kleckner, 2005; Adachi *et al*, 2008; Espeli *et al*, 2008). The colocalization period appears to be dependent on the locus tested and follows the general rule that colocalization is long in the MDs and short in the NS regions (Espeli *et al*, 2008). Recently, an analysis at high density of the Ori MD revealed that some regions, called SNAPs, displayed longer cohesion than others (Joshi *et al*, 2011). In the terminus region, the colocalization of sister chromatids could be particularly long and is dependent on the MatP/*matS* interaction (Mercier

et al, 2008). Because Ter MD migrated towards mid-cell to be replicated early in the cell cycle (10–20 min after division at 30°C in a 70-min cell cycle, 30–40 min after division at 25°C

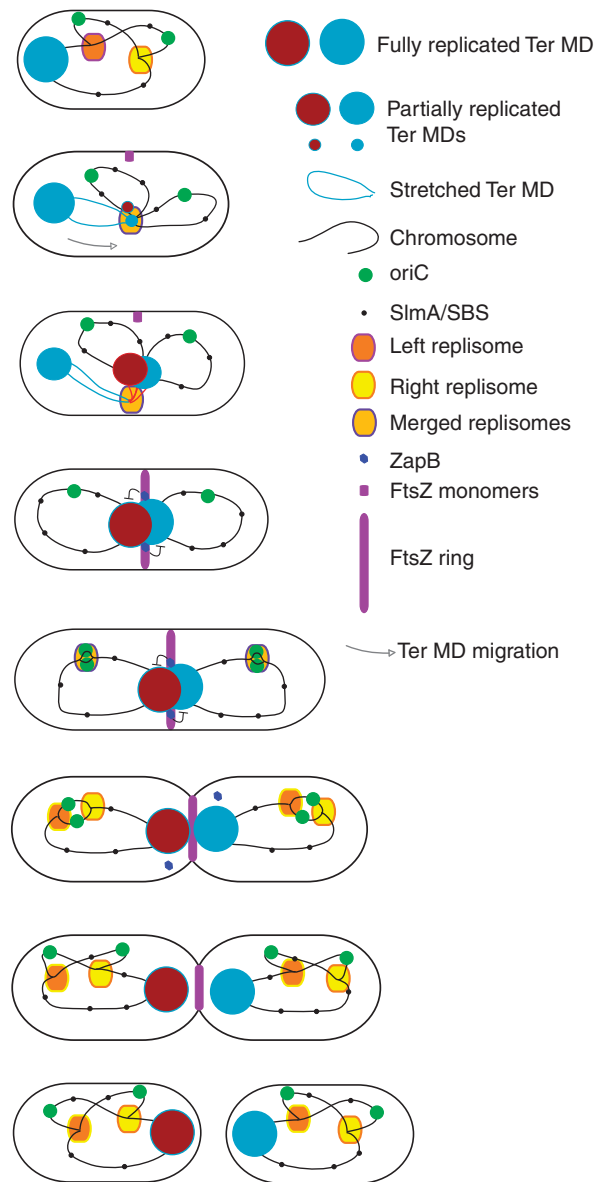


Figure 7 Model for the Ter MD dynamics during the cell cycle. Schematic diagram of a complete cell cycle, from birth to the next division. Steps of ~10 min are described. The dynamics of the Ter MD (red-brown ball) is proposed according to the observations described above. The migration of the Ter DNA is illustrated with an arrow. ZapB-mediated anchoring of the sister Ter MDs to the septal ring is illustrated.

Figure 6 Influence of ZapB-mediated anchoring on the Ter MD and chromosome dynamics. (A) MatP-mCherry (red) and ZapB-GFP (green) are colocalized in wild-type cells. (B) MatP-mCherry (red) and ZapA-GFP (green) are colocalized in wild-type cells. (C) MatP-mCherry (red) and ZapA-GFP (green) are not colocalized in the MG1655*zapB* mutants. (D) Histogram of the relative position of MatP-mCherry foci according to MG1655*zapB* cell size. Cells with 1, 2, 3 or 4 foci are indicated. (E) Histogram of the number of cells in each category of MatP-mCherry position (180 cells were counted). (F) MatP-mCherry (red) and ZapB-GFP (green) are not colocalized in the MG1655*zapA* strain. (G) Map of the tags inserted in the chromosome of the MG1655 *zapB* strain that were used in (H–J), *parS^{P1}* (Ter-3) and *parS^{DMT1}* (Ter-6) positions are represented. (H) Segregation of Ter-6 (*parS^{DMT1}*) tag. MG1655*zapB* cells were followed during a 120-min time lapse at 1-min intervals. One picture every 16 min was represented on the montage. Traces representing the segregation of the Ter-6 tag in the MG1655*zapB* cells annotated in the montage (a–d) and in wt MG1655 cells. (I) Measure of the interfocal distance between Ter-3 (*parS^{P1}*) and Ter-6 (*parS^{DMT1}*) loci in the MG1655, MG1655*matP* and MG1655*zapB* strains. (J) DAPI staining (green) of the nucleoid of the MG1655*zapA* strain grown in rich medium (LB). (K) DAPI staining of the nucleoid of the MG1655*zapB* strain. (L) DAPI staining of the nucleoid of the MG1655*matP* strain. (M) DAPI staining (green) of the nucleoid of the MG1655*zapAmatP* strain. (N) DAPI staining of the nucleoid of the MG1655*zapBmatP* strain. Cells presented on the panels (J–N) were grown in rich LB medium to O.D. = 0.3. Scale bars represent 3 µm.

in a 120-min cell cycle) and remained localized at mid-cell until septum constriction (20–30 min before division), we deduce that sister Ter MDs colocalize at mid-cell for 30–50 min. This prolonged step is strongly dependent on MatP (Mercier *et al*, 2008) but almost unaffected by the linearization of the chromosome (Figure 1). We observed that the MatP–mCherry focus that clustered the two sister Ter MDs associated with the division machinery at mid-cell. This colocalization is regulated because constriction or alteration of the FtsZ regulation allowed separation of FtsZ and MatP at mid-cell. ZapA and ZapB were required for an extended localization of the Ter MD at mid-cell and the bacterial two-hybrid assay revealed a ZapB–MatP interaction. ZapA and FtsZ are required to observe the interaction, indicating that MatP interacts with ZapB when it is associated with the divisome. Because the two-hybrid assay revealing the MatP–ZapB interaction was performed in *E. coli*, we cannot exclude that they do not interact directly but are brought together by a third, yet uncharacterized partner. ZapB dissociation from the septal ring (Galli and Gerdes, 2010) could be the trigger for segregation of the Ter MDs outside of the division plane as soon as constriction is initiated. However, plasmids with *matS* sites behaved differently; they remained associated to the septal ring until scission. This suggests that ZapB in the presence of *matS* plasmid remained associated with the constricting septal ring. An interesting possibility would be that other DNA metabolism process(es), for example, segregation in the *oriC* proximal region or nucleoid splitting (Bates and Kleckner, 2005), would trigger the loss of the Ter MD–septal ring association.

Alteration of MatP/septal ring anchoring perturbs nucleoid segregation

We analysed the behaviour of MatP–mCherry and *parS* tags under conditions in which the association with the septal ring was altered. *zapA* and *zapB* mutants altered the segregation pattern of the Ter MD during growth at a slow growth rate. As published previously (Ebersbach *et al*, 2008), these mutations had no major consequences on nucleoid segregation, even at a fast growth rate. In contrast to what was observed in the *matP* mutant, we did not observe a significant increase in the interfocal distance between the Ter loci in the *zapB* mutant, which indicated that internal organization of the Ter MD was not altered. Therefore, MatP interaction with the septal ring is not critical for its role as a MD organizer. In both MC1000 (Ebersbach *et al*, 2008) and MG1655 (this work) strains, inactivation of *zapB* resulted in a mild phenotype of elongated cells with no effect on mass doubling time. The most striking defects consisted in a small proportion of filamenting cells and the morphology of the FtsZ ring that formed arc-like and helix-like structures in the *zapB* strain. The interaction of MatP with ZapB is not essential to achieve chromosome segregation. In the absence of ZapB, many cells still presented a MatP focus at mid-cell. This may reflect other possibilities for MatP to persist at mid-cell and influence chromosome segregation, either by itself after binding Ter DNA or by interacting with another partner. As observed with other chromosome organization/segregation systems (i.e., ParABS systems), the anchoring of MatP to ZapB might appear to be essential when combined with other mutation(s) or specific growth conditions.

Remarkably, combining *matP* with *zapB* or *zapA* deletion has consequences on cell physiology and nucleoid segregation stronger than expected if the role of ZapB was simply to anchor the Ter MD at the septum. These results revealed a synergistic effect of the double mutation, indicating a putative role of ZapB in chromosome segregation that is important in the absence of MatP or a role of MatP in cytokinesis that is important in the absence of ZapB. We have not yet identified any direct involvement of MatP in cytokinesis. A challenge now is to identify whether either ZapB alone or the properly configured Z ring play a direct role in chromosome segregation.

Integration of chromosome management in the control of the cell cycle

Eukaryotic cells utilize a number of quality control systems, also called checkpoints, that block the cell cycle when one of the steps is not completed properly (Elledge, 1996; Tyson and Novak, 2008). Equivalent systems are not well characterized in bacteria. The SulA checkpoint is among the best unravelled. Following DNA damage and as a part of the SOS response, the SulA protein will favour the depolymerization of FtsZ and therefore block cell division (Huisman *et al*, 1984). The nucleoid occlusion system (Woldringh *et al*, 1991) has been molecularly characterized in *B. subtilis* and *E. coli* (Wu and Errington, 2004; Bernhardt and de Boer, 2005); in *E. coli*, it involves the SlmA protein, which binds to 24 SBS sites along the chromosome and blocks FtsZ polymerization when SBS sites remain in the division plane. Remarkably, SBS sites are excluded from the Ter MD (Cho *et al*, 2011; Tonthat *et al*, 2011). Presumably, the selection of *matS* sites in the Ter region and SBS sites outside the Ter region ensure coordination of chromosome segregation with cell division: SlmA act as a negative regulator of cell division if the non-Ter region is found at mid-cell whereas *matS* sites promote the anchoring of the Ter MD near the division machinery. While SlmA acts in a checkpoint controlling chromosome segregation and if necessary blocks cytokinesis, MatP acts as an organizer that anchors the Ter MD to mid-cell to get the chromosome ready for segregation. An association between the septal ring and the terminus region of the chromosome has already been described for decatenation of entangled chromosomes (Hojgaard *et al*, 1999; Espéli *et al*, 2003) and chromosome dimer resolution (Blakely *et al*, 1991; Steiner *et al*, 1999). A challenge now is to determine whether the MatP–ZapB interaction influences these transactions or another as yet uncharacterized process.

Materials and methods

Strains and growth conditions

Strains and plasmids are described in Supplementary Table S1. MG1655, MG58, MG59 and their derivatives were grown in minimal medium A supplemented with casamino acids (0.2%) and glucose (0.5%) unless specified. Strains MKG297 and MKG305 were grown in minimal medium A supplemented with casamino acids (0.2%) and succinate (0.5%), and 30 min before observation, arabinose (0.1%), IPTG (5 μ M) and anhydro-tetracyclin (40 ng/ml) were added (Lau *et al*, 2003). The ZapA–GFP and ZapB–GFP fusion proteins were observed following a brief induction of the P_{BAD} promoter during 10 min in the presence of arabinose (0.2%) (Ebersbach *et al*, 2008). The FBGT2 strain has been obtained by a transposition event of a segment of the Right MD in the Ter MD (Thiel *et al*, 2012).

Microscopy

Bacteria were grown at 30°C (unless specified) in the indicated medium until O.D. = 0.2, washed in fresh medium and concentrated 10 times. Then, 2 µl were spread on agarose and immediately observed using a Leica DM6000 microscope, a coolsnap HQ CCD camera (Roper) and Metamorph software or a Zeiss axio observer Z1 microscope, an Evolve EM-CCD camera (Roper) and Axiovision software. The analysis was performed with ImageJ software. The Stackreg (Thevenaz *et al*, 1998) and the MtrackJ (Meijering *et al*, 2012) plugins were used for the analysis of time-lapse images; the Pointpicker plugin was used for snapshot analyses. Custom-made Excel sheets were used to monitor the cell size, focus positions, inter-focal distance, septum constriction, fluorescence intensity and DNA mobility. Septum constriction was monitored, thanks to a line scan analysis of the phase-contrast images. We empirically determined that a 20% reduction of the phase signal, measured at mid-cell, was the threshold to consider invagination. For each snapshot experiment, at least 180 cells were counted.

Two-hybrid assay

BTH101 or BTH101 ΔzapA cells were cotransformed by the pUT18c or the pUT18c matPΔN30 and the pKT25, pKT25ΔN30 matP, pKT25zapA, pKT25zapB, pKT25zapB_{Δ6}, pKT25zapB_{Δ11}, pKT25zapB_{L,C} plasmids. Transformed cells were streaked on LB

plates supplemented with Xgal (20 µg/ml) and IPTG (500 µM) and incubated for 2 days at 30°C.

Supplementary data

Supplementary data are available at *The EMBO Journal* Online (<http://www.embojournal.org>).

Acknowledgements

We thank K Gerdes, T Horiuchi, D Ladent, B Michel and D Sherratt for the kind gift of strains and plasmids; S Duigou, B Michel, L Sperling, M Valens and I Vallet-Gely for critically reading the manuscript and thoughtful discussions. This work was supported by CNRS and ANR (Grant ANR 08-Blan-0119 2009-2012 to FB and ANR JCJC 2010-2014 SISTERS to OE).

Author contributions: OE, RB, PD, AT and EG performed the experiments; OE, RB, PD, RM and FB designed the experiments; FB and OE wrote the manuscript.

Conflict of interest

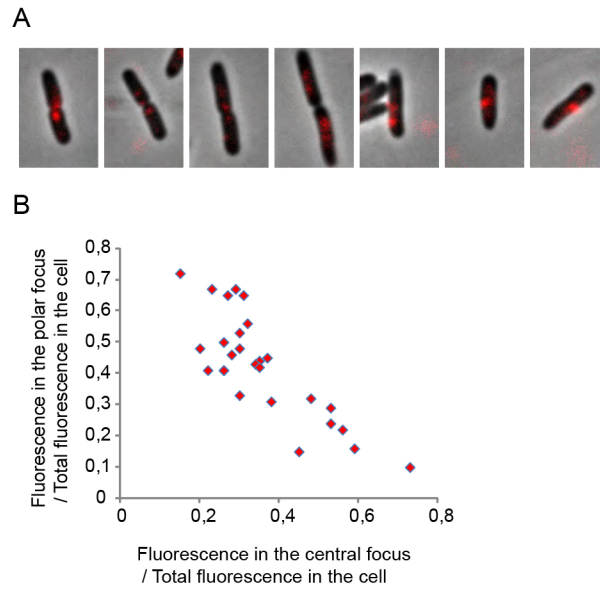
The authors declare that they have no conflict of interest.

References

- Adachi S, Fukushima T, Hiraga S (2008) Dynamic events of sister chromosomes in the cell cycle of *Escherichia coli*. *Genes Cells* **13**: 181–197
- Adams DW, Errington J (2009) Bacterial cell division: assembly, maintenance and disassembly of the Z ring. *Nat Rev Microbiol* **7**: 642–653
- 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
- Bernhardt TG, de Boer PA (2005) SlmA, a nucleoid-associated, FtsZ binding protein required for blocking septal ring assembly over Chromosomes in *E. coli*. *Mol Cell* **18**: 555–564
- Blakely G, Colloms S, May G, Burke M, Sherratt D (1991) *Escherichia coli* XerC recombinase is required for chromosomal segregation at cell division. *New Biol* **3**: 789–798
- Cho H, McManus HR, Dove SL, Bernhardt TG (2011) Nucleoid occlusion factor SlmA is a DNA-activated FtsZ polymerization antagonist. *Proc Natl Acad Sci USA* **108**: 3773–3778
- Cui T, Moro-oka N, Ohsumi K, Kodama K, Ohshima T, Ogasawara N, Mori H, Wanner B, Niki H, Horiuchi T (2007) *Escherichia coli* with a linear genome. *EMBO Rep* **8**: 181–187
- Ebersbach G, Galli E, Moller-Jensen J, Lowe J, Gerdes K (2008) Novel coiled-coil cell division factor ZapB stimulates Z ring assembly and cell division. *Mol Microbiol* **68**: 720–735
- Elledge SJ (1996) Cell cycle checkpoints: preventing an identity crisis. *Science* **274**: 1664–1672
- Esnault E, Valens M, Espéli O, Boccard F (2007) Chromosome structuring limits genome plasticity in *Escherichia coli*. *PLoS Genet* **3**: e226
- Espéli O, Lee C, Mariani KJ (2003) A physical and functional interaction between *Escherichia coli* FtsK and topoisomerase IV. *J Biol Chem* **278**: 44639–44644
- Espéli O, Mercier R, Boccard F (2008) DNA dynamics vary according to macrodomain topography in the *E. coli* chromosome. *Mol Microbiol* **68**: 1418–1427
- Galli E, Gerdes K (2010) Spatial resolution of two bacterial cell division proteins: ZapA recruits ZapB to the inner face of the Z-ring. *Mol Microbiol* **76**: 1514–1526
- Galli E, Gerdes K (2012) FtsZ-ZapA-ZapB interactome of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **194**: 292–302
- Gueiros-Filho FJ, Losick R (2002) A widely conserved bacterial cell division protein that promotes assembly of the tubulin-like protein FtsZ. *Genes Dev* **16**: 2544–2556
- 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
- Huisman O, D'Ari R, Gottesman S (1984) Cell-division control in *Escherichia coli*: specific induction of the SOS function SfiA protein is sufficient to block septation. *Proc Natl Acad Sci USA* **81**: 4490–4494
- Joshi MC, Bourniquel A, Fisher J, Ho BT, Magnan D, Kleckner N, Bates D (2011) *Escherichia coli* sister chromosome separation includes an abrupt global transition with concomitant release of late-splitting intersister snaps. *Proc Natl Acad Sci USA* **108**: 2765–2770
- Lau IF, Filipe SR, Soballe B, Okstad OA, Barre FX, Sherratt DJ (2003) Spatial and temporal organization of replicating *Escherichia coli* chromosomes. In *Mol Microbiol* **49**, pp 731–743. England
- Lemon KP, Grossman AD (2001) The extrusion-capture model for chromosome partitioning in bacteria. *Genes Dev* **15**: 2031–2041
- Li Y, Sergueev K, Austin S (2002) The segregation of the *Escherichia coli* origin and terminus of replication. *Mol Microbiol* **46**: 985–996
- Meijering E, Dzyubachyk O, Smal I (2012) Methods for cell and particle tracking. In *Methods Enzymol* **504**, pp 183–200. United States
- Mercier R, Petit MA, Schbath S, Robin S, El Karoui M, Boccard F, Espéli O (2008) The MatP/matS site-specific system organizes the terminus region of the *E. coli* chromosome into a macrodomain. *Cell* **135**: 475–485
- Nielsen HJ, Li Y, Youngren B, Hansen FG, Austin S (2006) Progressive segregation of the *Escherichia coli* chromosome. *Mol Microbiol* **61**: 383–393
- Niki H, Yamaichi Y, Hiraga S (2000) Dynamic organization of chromosomal DNA in *Escherichia coli*. *Genes Dev* **14**: 212–223
- Possoz C, Junier I, Espéli O (2012) Bacterial chromosome segregation. In *Front Biosci* **17**, pp 1020–1034. United States
- Reyes-Lamothe R, Possoz C, Danilova O, Sherratt DJ (2008a) Independent positioning and action of *Escherichia coli* replisomes in live cells. *Cell* **133**: 90–102
- Reyes-Lamothe R, Wang X, Sherratt D (2008b) *Escherichia coli* and its chromosome. *Trends Microbiol* **16**: 238–245
- Sawitzke JA, Austin S (2000) Suppression of chromosome segregation defects of *Escherichia coli* muk mutants by mutations in topoisomerase I. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**: 1671–1676
- Shapiro L, McAdams HH, Losick R (2009) Why and how bacteria localize proteins. *Science* **326**: 1225–1228

- 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**: 579–583
- Thanbichler M, Wang SC, Shapiro L (2005) The bacterial nucleoid: a highly organized and dynamic structure. *J Cell Biochem* **96**: 506–521
- Thiel A, Valens M, Vallet-Gely I, Espéli O, Boccard F (2012) Long-range chromosome organization in *E. coli*: a site-specific system isolates the Ter macrodomain. *PLoS Genet* **8**: e1002672
- Thevenaz P, Ruttimann UE, Unser M (1998) A pyramid approach to subpixel registration based on intensity. *IEEE Trans Image Process* **7**: 27–41
- Tonthat NK, Arold ST, Pickering BF, Van Dyke MW, Liang S, Lu Y, Beuria TK, Margolin W, Schumacher MA (2011) Molecular mechanism by which the nucleoid occlusion factor, SlmA, keeps cytokinesis in check. *EMBO J* **30**: 154–164
- Toro E, Shapiro L (2010) Bacterial chromosome organization and segregation. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **2**: a000349
- Tyson JJ, Novak B (2008) Temporal organization of the cell cycle. *Curr Biol* **18**: R759–R768
- Valens M, Penaud S, Rossignol M, Cornet F, Boccard F (2004) Macrodomain organization of the *Escherichia coli* chromosome. *EMBO J* **23**: 4330–4341
- Wang X, Liu X, Possoz C, Sherratt DJ (2006) The two *Escherichia coli* chromosome arms locate to separate cell halves. *Genes Dev* **20**: 1727–1731
- White MA, Eykelenboom JK, Lopez-Vernaza MA, Wilson E, Leach DR (2008) Non-random segregation of sister chromosomes in *Escherichia coli*. *Nature* **455**: 1248–1250
- Woldringh CL, Mulder E, Huls PG, Vischer N (1991) Toporegulation of bacterial division according to the nucleoid occlusion model. *Res Microbiol* **142**: 309–320
- Wu LJ, Errington J (2004) Coordination of cell division and chromosome segregation by a nucleoid occlusion protein in *Bacillus subtilis*. *Cell* **117**: 915–925

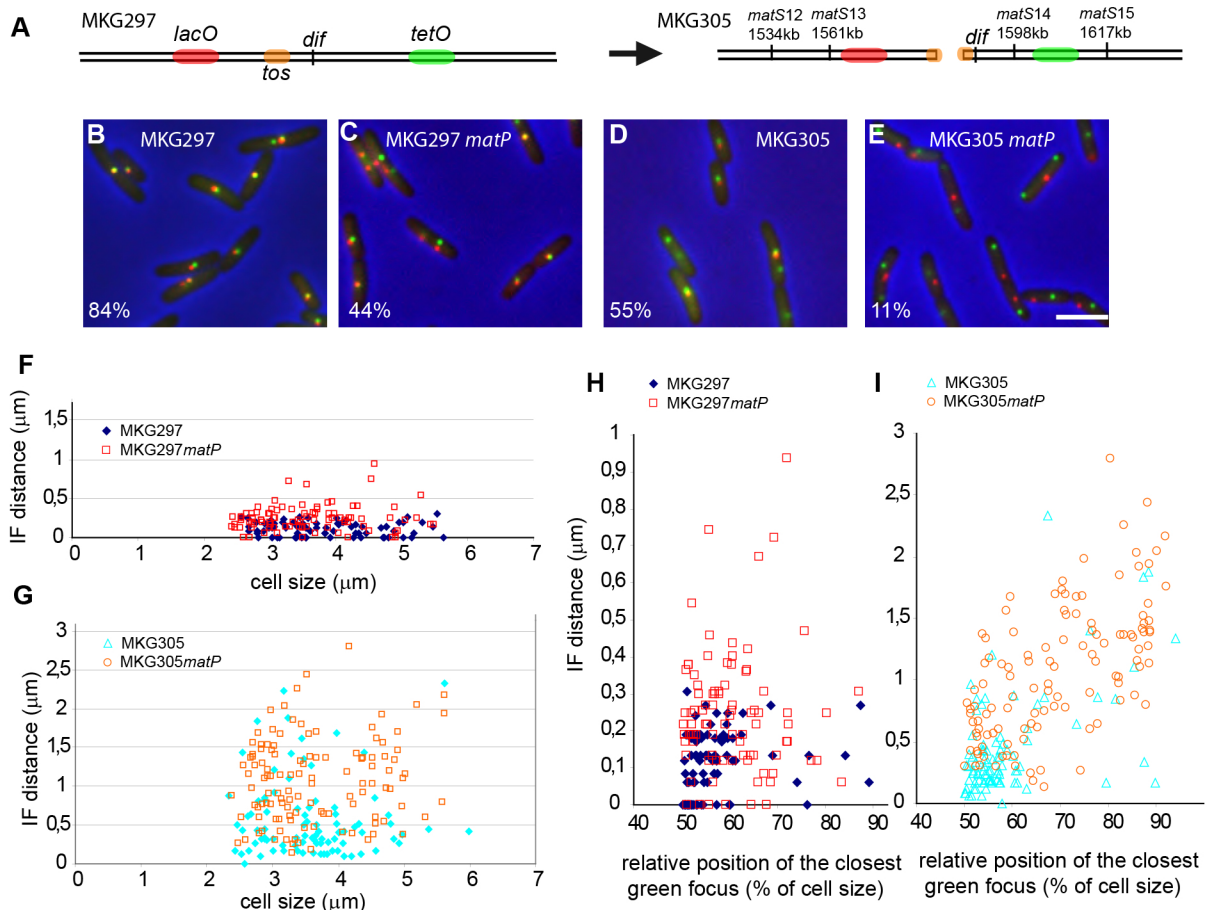
II. Résultats complémentaires de l'article : "A MatP-divisome interaction coordinates chromosome segregation with cell division in *E. coli*"



Espéli_Supplementary Fig S1.

Figure S1. Organization of the MatP foci

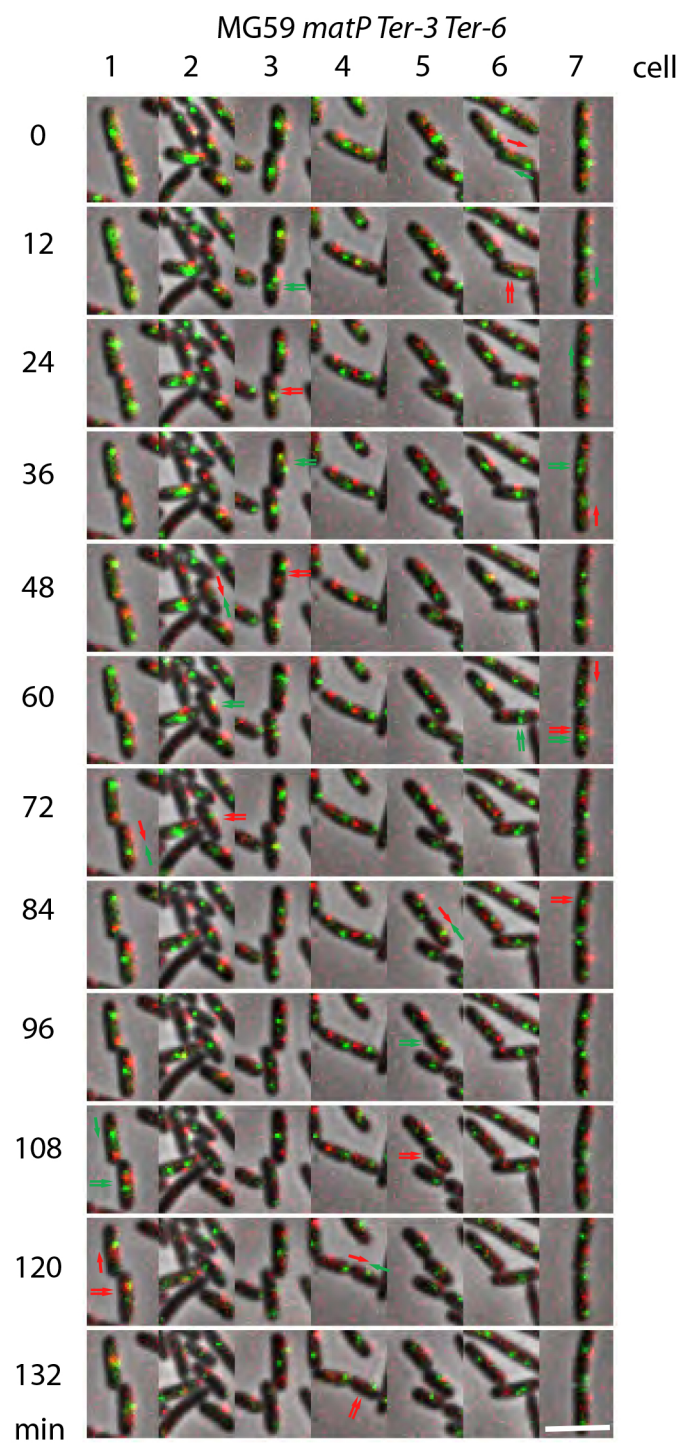
A) Merged pictures of MatP-mCherry (red) and phase contrast micrographs (gray) of MG1655 cells with a circular chromosome. Only small cells with one or two MatP foci were shown; **B)** quantification of the amount of fluorescence presents in each MatP focus in small cells with two MatP foci.



Espéli_Supplementary Fig. S2

Figure S2. MatP holds the ends of a linear chromosome at mid-cell

Snapshot analysis of the localization of the ends of a linear chromosome in the presence or absence of MatP. **A)** Maps of the MKG297 (MG1655 with a circular chromosome) and MKG305 (MG1655 with a linear chromosome) strains. **B)** Merged pictures of the *lacO* array (red), *tetO* array (green) and phase-contrast microscopy (blue) in cells with a circular chromosome (strain MKG297). The percentage of cells presenting mid-cell colocalized *lacO* and *tetO* foci is indicated. **C)** Merged pictures, as in (B), of the *matP* cells with a circular chromosome (MKG297*matP*). **D)** Merged pictures, as in (B), of the cells with a linearized chromosome (MKG305). **E)** Merged pictures, as in (B), of the *matP* cells with a linearized chromosome (MKG305*matP*). **F)** The distance between *tetO* and *lacO* foci from a circular chromosome is moderately increased in the absence of MatP. Histogram of the inter-focal distance between pairs of the closest *lacO* and *tetO* foci according to cell size in MKG297 (blue) and MKG297*matP* (red). **G)** The distance between *tetO* and *lacO* foci from a linear chromosome is dramatically increased in the absence of MatP. Histogram of the inter-focal distance between pairs of the closest *lacO* and *tetO* foci according to cell size in MKG305 (cyan) and MKG305*matP* (orange). **H)** The smallest interfocal distances between pairs of the *lacO* and *tetO* foci were observed when one of the foci was localized at mid-cell. Histograms of the inter-focal distance between pairs of the closest *lacO* and *tetO* foci according to the position of the *tetO* focus in the strain with circular chromosome MKG297 (blue), MKG297*matP* (red); **I)** Same as (H) for the cells with linear chromosome MKG305 (cyan) and MKG305*matP* (orange). The cells were grown until O.D. 0.2 in minimal medium supplemented with casamino acids, and succinate, arabinose (0.02%), IPTG (50 μ M) and anhydrotetracycline (50 μ M) were added 20 min before observation. Scale bar is 3 μ m.



Espéli_Supplementary Fig. S3

Figure S3. Migration of the Ter DNA to mid-cell is not dependent on MatP

Merged pictures of a time-lapse experiment with 12 min intervals for the segregation of the Ter-3 (red) and Ter-6 (green) loci in strain MG59*matP* (linear chromosome). Seven representative cells are displayed. The purple boxes highlight cells presenting a mid-cell colocalization of the Ter-3 and Ter-6 tags. The full timelapse for these 7 cells corresponds to 67 pictures (1 picture/2min). Scale bar is 3 μm .

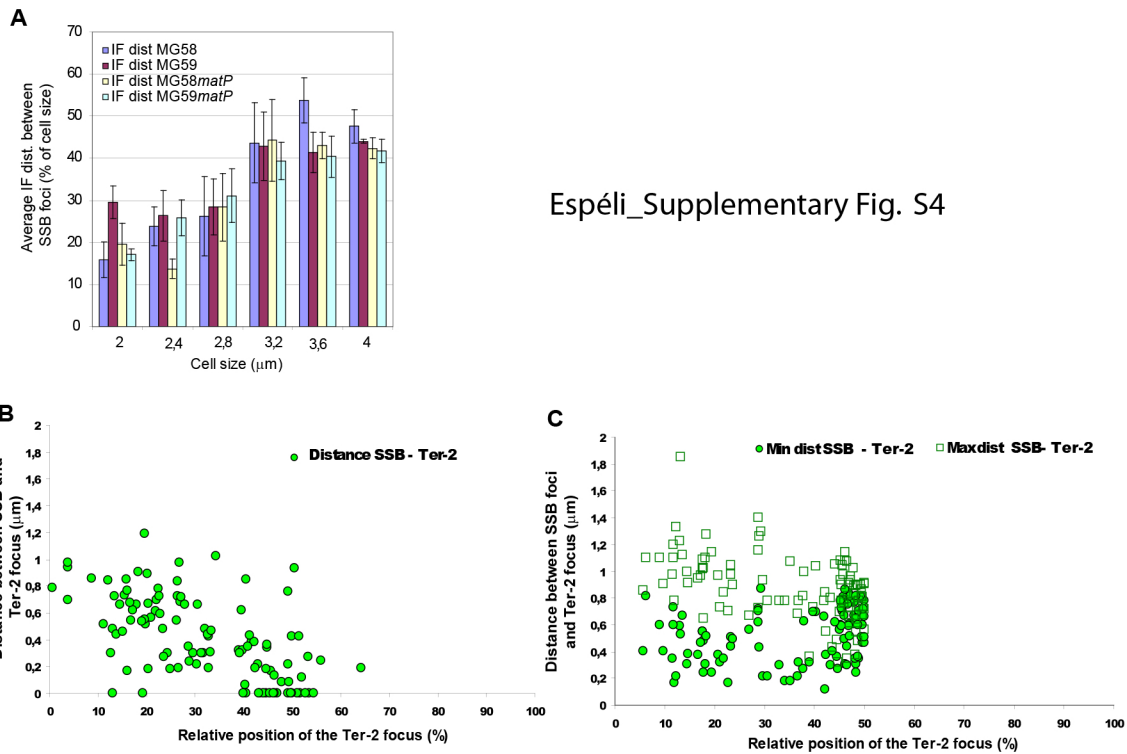
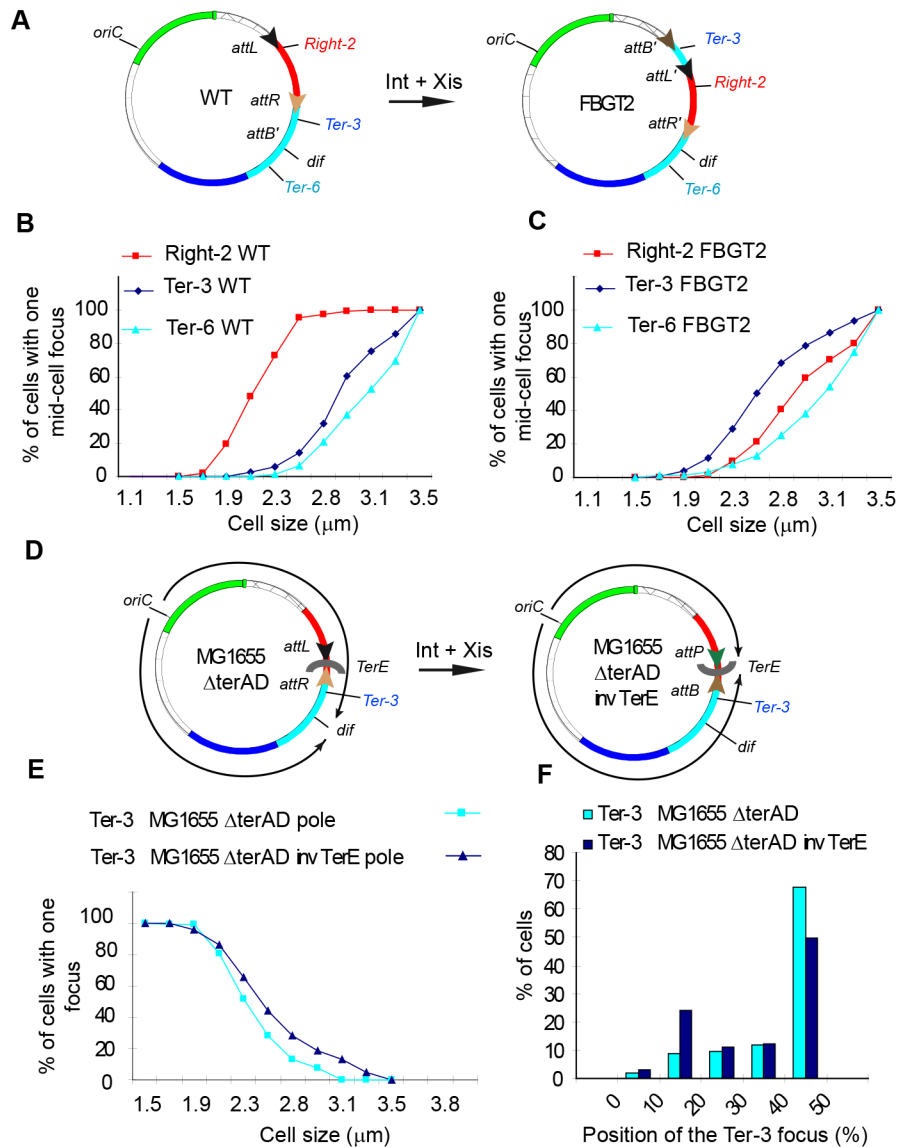


Figure S4. Characterization of the replisome pattern in *E. coli* strains with linear chromosome.

A) Measure of the interfocal distance between SSB-Ypet foci in MG58 (circular chromosome), MG58matP, MG59 (linear chromosome) and MG59matP strains containing two SSB-YPet foci. The histogram corresponds to the average distance in a specific cell size category. This experiment reveals that two categories of cells with two SSB foci are present in the population: small cells ($< 3\mu\text{m}$) with close SSB-YPet foci and large cells ($>3\mu\text{m}$) with distant SSB-YPet foci. **B)** Measure of the distance between SSB-YPet and the Ter-2 tag foci in MG59 cells containing only one SSB-YPet focus. The SSB-Ter-2 distance is plotted according to the position of the Ter-2 focus (this graph supports the data presented on Figure 2D). **C)** Measure of the distances between SSB-YPet and the Ter-2 tag foci in MG59 cells containing two SSB-YPet foci and one ter-2 focus (this graph supports the data presented on Figure 2E). The SSB-Ter-2 distance is plotted according to the position of the Ter-2 focus. For each cell the larger (Maxdist) and smaller (Mindist) distance are plotted.

Espeli_Supplementary Fig.S5

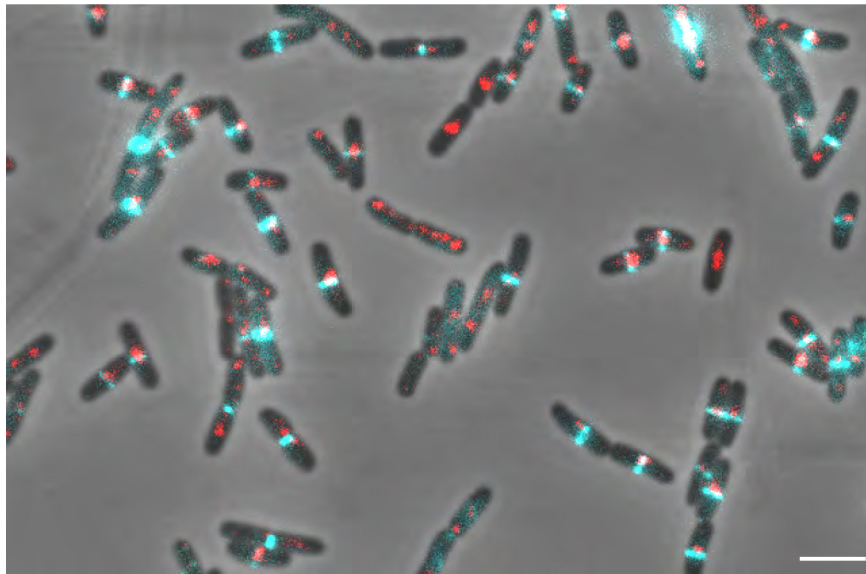


Legend of Figure S5.

A) Map of the FBGT2 before and after transposition; the Ori MD (green), NS regions (stripes), Right MD (red), Left MD (dark blue) and Ter MD (cyan) are represented. The positions of the Right-2, Ter-3, Ter-6 and Ter-7 *parS*^{P1} tags are represented. The transposition is mediated by the Int + Xis excision of the Right MD from the *attL* and *attR* sites and its subsequent integration into the *attB'* site (Thiel et al., in press). **B**) Cumulative curve representing the presence at mid-cell (position of the focus comprised between 45 and 50% of the cell size) of the Right-2, Ter-3 and Ter-6 loci in the parental FBGT2-NT strain. Only cells with one focus for each tag were taken into account. **D**) Cumulative curves representing the presence at mid-cell (position of the focus comprised between 45 and 50% of the cell size) of the Right-2, Ter-3 and Ter-6 loci in the FBGT2 strain with a transposed Right MD. **D to F**) Analysis of the Ter-3 focus migration to mid-cell following a replication delay imposed by the *terE* Tus binding site inversion **D**) Map of the MG1655 Δ *terAD* and MG1655 Δ *terAD*-*invterE* strains. Inversion of *terE* is mediated by the Int + Xis recombination at the *attL* and *attR* sites. Black arrows represent the replication arms. **E**) Cumulative curve representing the departure from the pole (position of the focus < 30% of the cell size) of the Ter-3 tag. Only cells with one focus for each tag were analyzed. **F**) Histogram of the % of cells present in each category defined by the Ter-3 focus position.

Supplementary text for Figure S5 : Timing of migration to mid-cell for Ter loci depends on their position on the genetic map

We performed chromosome rearrangements to test directly the influence of the position on the genetic map on the migration of Ter loci. In a strain in which Ter MD has been interrupted by the Right MD, i.e. a large Ter MD region is present at an ectopic position replicated 600 kb earlier (strain FBGT2 in Figure S5A), we analyzed the positioning of three *parS* tags (Right-2, Ter-3 and Ter-6). We focused on small cells presenting only one focus of the tag and analyzed at what cell age it was localized at mid-cell. In wt strains, the small cells presented one Right-2 focus localized either near mid-cell or around the quarter position (Supplementary Figure S5 A-C), as observed previously (Espeli et al. 2008) in agreement with the asymmetric segregation of the replichores (Wang et al. 2006). When cells reached 2.3 μm , every cell presented two Right-2 foci. The new-born cells presented polar Ter-3 and Ter-6 foci. The Ter-3 and Ter-6 loci migrated to mid-cell when the cells reached 3.1 μm , (Supplementary Figure S5B). In the FBGT2 strain (Supplementary Figure S5C), the pattern of localization is altered: a vast majority of the new-born cells presented one Ter-3, one Right-2 and one Ter-6 focus at the pole. The Ter-3 focus is the first to reach mid-cell (before 2.7 μm). A migration of the Right-2 focus toward mid-cell is observed when the cell reached 3.1 μm . The Ter-6 locus localization remained unchanged; it served as a control and, as expected, its migration timing is unaltered following transposition. Altogether these observations suggested that arrival at mid-cell for a locus in the terminus region can be observed earlier when it was replicated earlier. In a second set of chromosome rearrangements, using a strain with unbalanced replication arms (Esnault et al. 2007), we observed that delaying the replication of a locus from the terminus region (Ter-3 tag) would also delay its timing of migration toward mid-cell (Supplementary Figure S5 D-F). Migration to mid-cell for a locus in the terminus region is therefore coordinated with its replication. Altogether, these results (Figures 4 to 6) show that replication has direct consequences on the sub-cellular positioning of the terminus region during the cell cycle.



27% of the cells present only one MatP-mCherry focus and one FtsZ-CFP ring colocalized at mid-cell
60% of the cells present one of the MatP-mCherry foci and one FtsZ-CFP ring colocalized at mid-cell

Espéli_Supplementary Fig. S6

Figure S6. MatP forms a mid-cell focus colocalized with the septal FtsZ ring protein in a strain with a linear chromosome.

Merged pictures of MatP-mCherry (red), FtsZ-CFP (cyan) and phase-contrast microscopy (gray) of the MG59 cells grown in minimal medium supplemented with casamino acids and glucose. The percentage of cells with only one MatP focus colocalized with the FtsZ ring or at least one MatP focus colocalized with the FtsZ ring are indicated. (200 cells were counted).

Scale bar is 3 μm .

Espeli_Supplementary Fig.S7

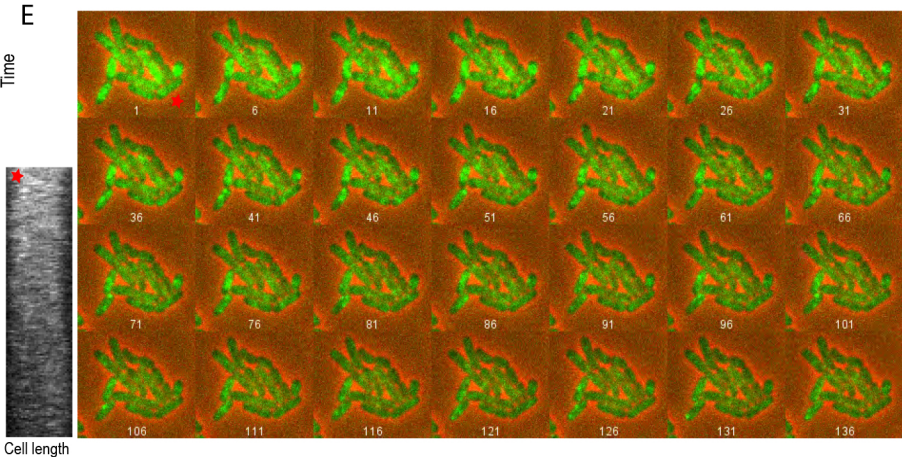
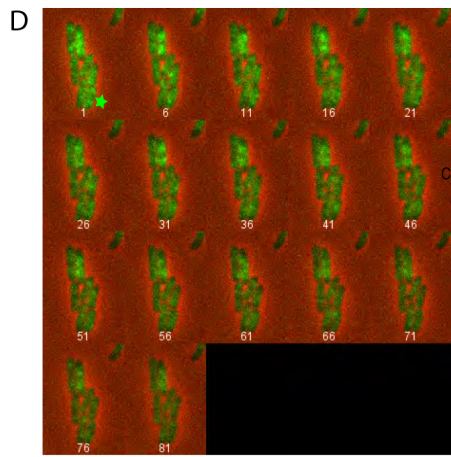
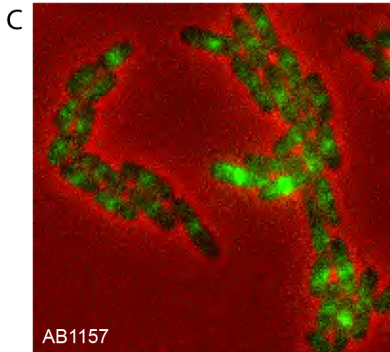
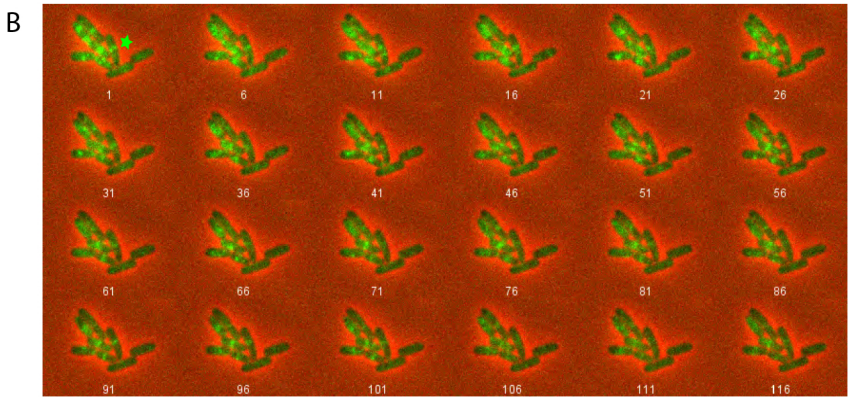
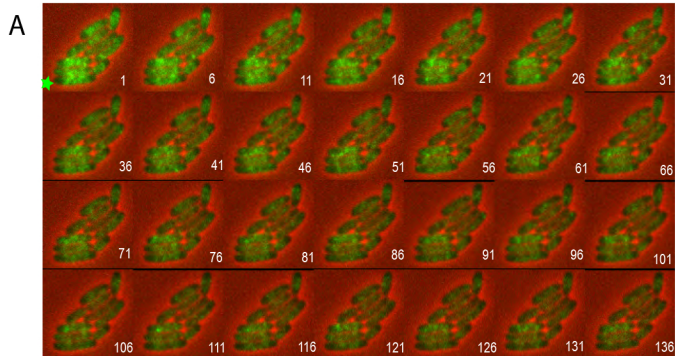
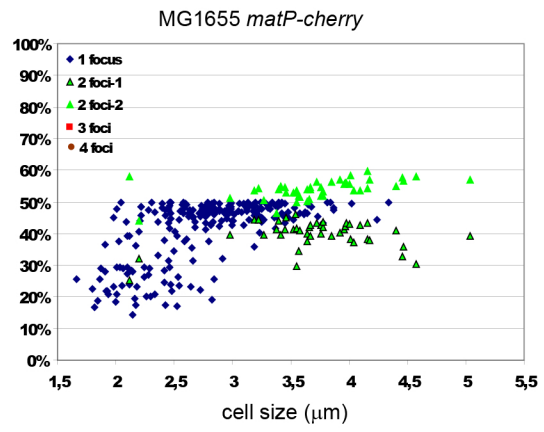
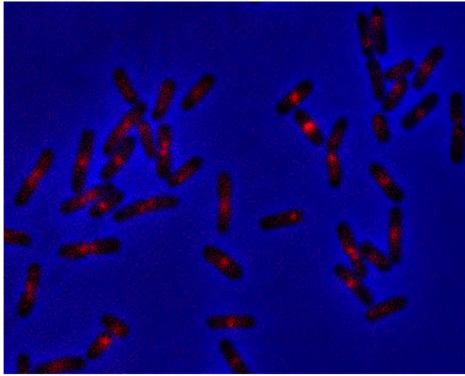


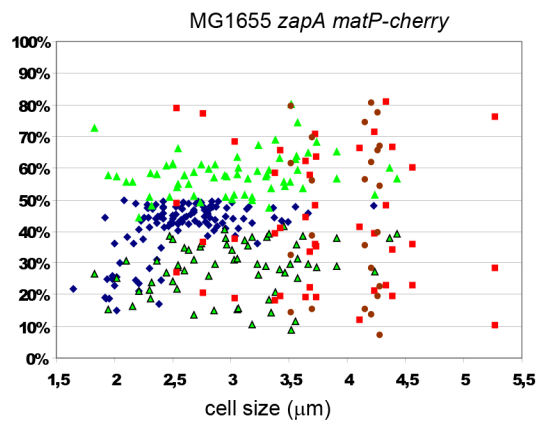
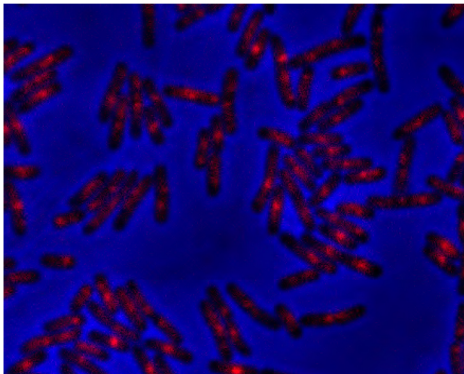
Figure S7. MatP anchors plasmids with the mats sites to the division septum.

A) Time-lapse experiment representing the dynamics of the pGB2-parST1 plasmid in MG1655. Positioning of the plasmid was observed for 136 min with 1 min intervals. A kymograph of the plasmid fluorescence dynamics in a representative cell (highlighted with a green star) is represented. **B)** Time-lapse experiment representing the dynamics of the pGB2-parST1-2matS plasmid in MG1655. Positioning of the plasmid was observed for 116 min with 1 min intervals. A kymograph of the plasmid fluorescence dynamics in a representative cell (highlighted with a green star) is represented. **C)** Characteristic field of the localization of the pGB2-parST1-2matS plasmid in the AB1157 strain. **D)** Time-lapse experiment representing the dynamics of the pGB2-parST1-2matS plasmid in MG1655*matP*. Positioning of the plasmid was observed for 81 min with 1 min intervals. A kymograph of the plasmid fluorescence dynamics in a representative cell (highlighted with a green star) is represented. **E)** Time-lapse experiment representing the dynamics of the pGB2-parST1-2matS plasmid in MG1655*zapB*. Positioning of the plasmid was observed for 136 min with 1 min intervals. A kymograph of the plasmid fluorescence dynamics in a representative cell (highlighted with a red star) is represented.

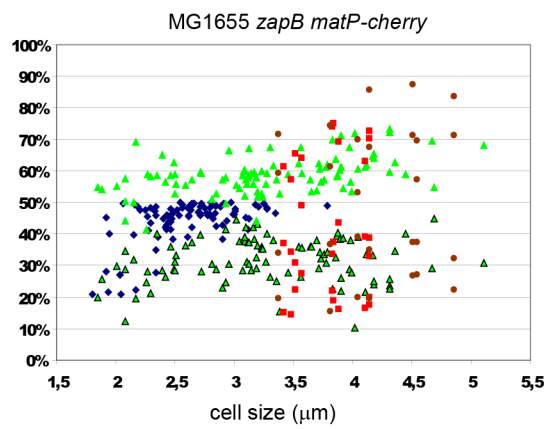
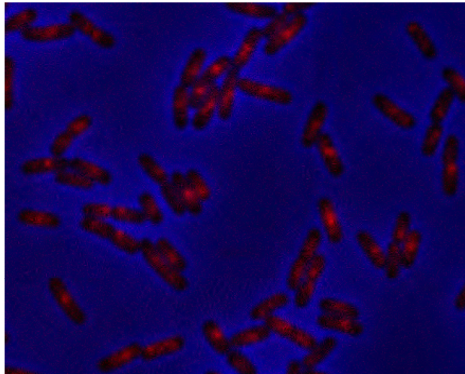
MG1655 *matP*-cherry



MG1655 *zapA* *matP*-cherry



MG1655 *zapB* *matP*-cherry



MG1655 *zapC* *matP*-cherry

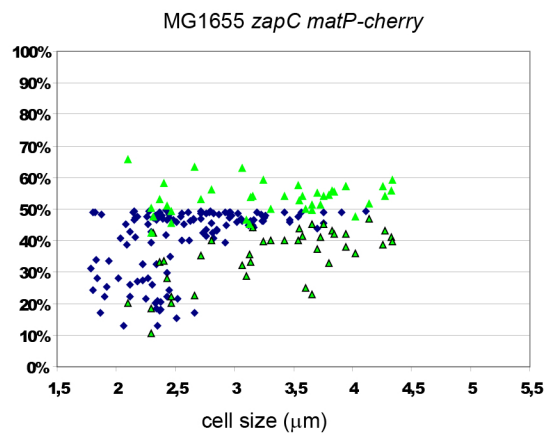
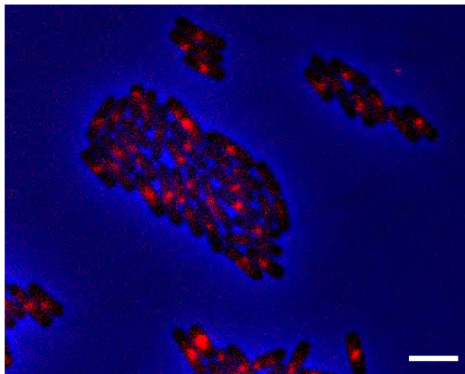
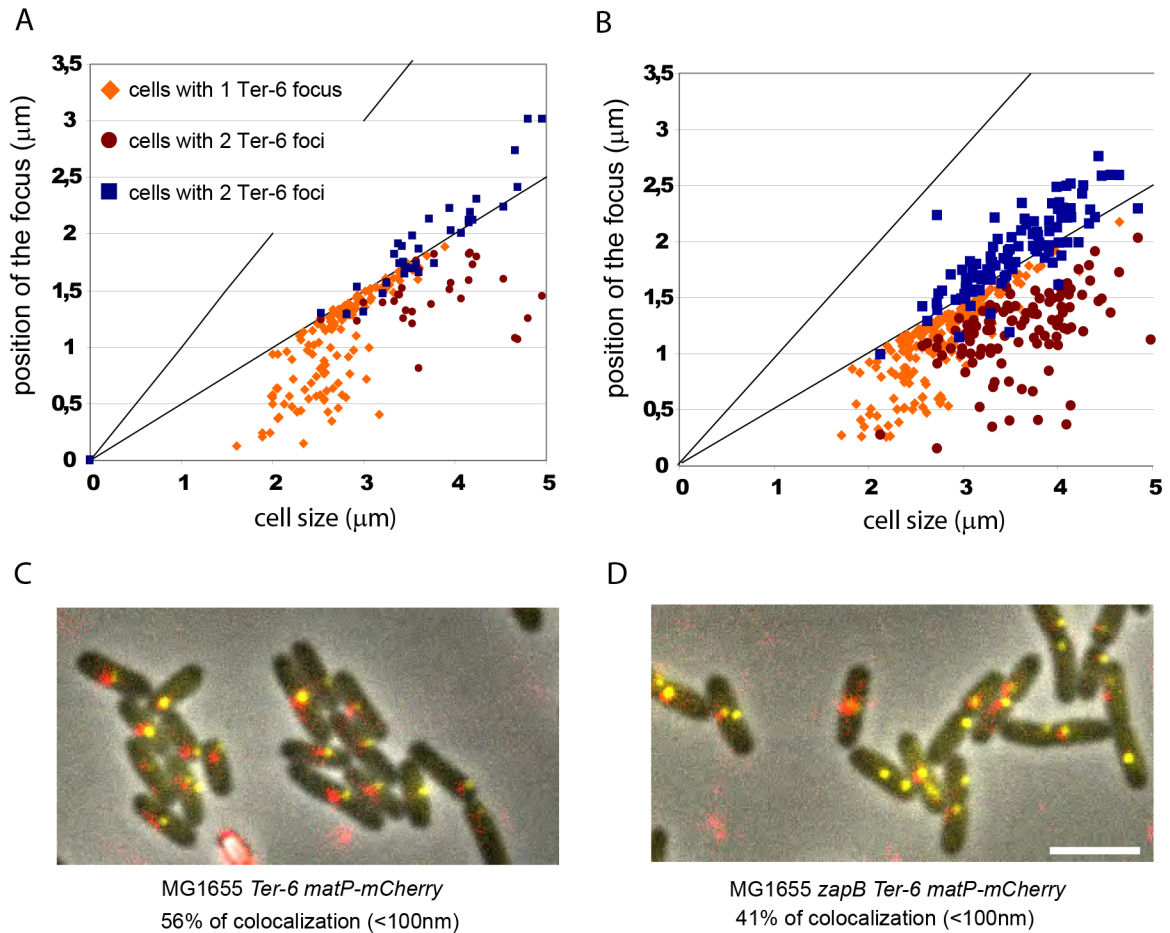


Figure S8. Influence of the *zapA*, *zapB* and *zapC* deletions on the MatP-mCherry localization

For each strain, a representative field and an histogram of the relative position of the MatP-mCherry foci according to cell size are displayed (about 200 cells were counted for each strain). Scale bar is 3 μm .



Espéli_Supplementary Fig. S9

Figure S9. Influence of the *zapB* deletion on the Ter-3 tag localization

A) Histogram representing the Ter-3 foci localization according to the cell size of the MG1655 strain (200 cells were counted). B) Histogram representing the Ter-3 foci localization according to the cell size of the MG1655*zapB* strain (200 cells were counted). C) Representative picture of the colocalization between MatP-mCherry (red) and the Ter-3 tag (yellow) in MG1655*matP-mcherry* strain D) Representative picture of the colocalization between MatP-mCherry and the Ter-3 tag in MG1655*zapB matP-mcherry* strain. The percentage of colocalized Ter-3 and MatP foci (Inter focal distance <100nm) is indicated. Scale bar is 3 μm .

Matériels et méthodes

Matériel et méthodes

- Milieux

Les souches ont été cultivées en milieu LB (Luria Broth) ou minimum A complété avec des acides casaminés (0,12%) du glucose (0,5%) ou du glycérol (0,2%) ou du succinate (0,5%), à 22°C ou 30°C ou 40°C ou 42°C. Les différents antibiotiques utilisés sont : la kanamycine (50 µg/ml), la spectinomycine (25 µg/ml), le chloramphénicol (15 µg/ml) et la tétracycline (15 µg/ml), ampicilline (100 µg/ml).

- Souches et plasmides

Les souches et plasmides utilisés sont présentés dans les résultats complémentaires Table S1 (Lesterlin et al., 2012), Table S1 (en annexe (Espéli et al., 2012)) et Table M1. Toutes les souches d'*E. coli* K12 utilisées dérivent de la souche MG1655.

Les sites *parSP1* sont obtenus par amplification à partir du plasmide pGBKD3-*parSP1* et insérés dans des régions intergéniques de gènes non-essentiels. La protéine de fusion ParB-GFP est portée par le plasmide pALA2705 (Li et al., 2003).

Le système *lacloxP* est intégré dans le chromosome par la méthode « λ red » (Datsenko and Wanner, 2000) par amplification à partir du plasmide pGBlacloxP-21loxP pour le système intermoléculaire, et pGBlacloxP-*rif*-loxP pour le système intramoléculaire. Les amorces prévues à cet effet sont présentées Table S2 (Lesterlin et al., 2012). Les systèmes *laclox* sont intégrés aux mêmes sites d'intégration que les sites *parS*. L'expression de la recombinase Cre est portée par le plasmide pCre inducible à l'arabinose (0,1%).

- Microscopie et analyses d'images

Pour les études au microscope de cellules fixées, les souches sont cultivés sur milieu LB ou minimum A complété avec 0,2% de glycérol et 0,12% d'acides casaminés, puis fixées par PFA (PBS 1X, para-formaldéhyde 4%, glutaraldéhyde 0.06%) (volume 1 :1) pendant 20min à 4°C, marquées par DAPI. Les cellules sont lavées dans 1ml de PBS 1X, puis concentrées suivant la taille du culot dans 50µl à 100µl de PBS 1X. La lame est préalablement enduite d'un milieu solide PBS 1X agarose 1%.

Table M1 : Strains and plasmids

Strain	Genotype	Reference
<i>migS</i>	MG1656 <i>migS</i> :: <i>cat</i>	Yamaichi K. et al., 2004
EG87	Ori-1 interSC <i>migS</i> :: <i>cat</i>	This work
EG88	Ori-3 interSC <i>migS</i> :: <i>cat</i>	This work
EG89	Ori-1 intrRASC <i>migS</i> :: <i>cat</i>	This work
EG90	Ori-3 intrRASC <i>migS</i> :: <i>cat</i>	This work
<i>dam</i>	MG1656 <i>dam</i> :: <i>cat</i>	Lab collection
EG91	Ori-3 interSC <i>dam</i> :: <i>cat</i>	This work
EG92	Ter-1 interSC <i>dam</i> :: <i>cat</i>	This work
EG93	Ori-3 intrRASC <i>dam</i> :: <i>cat</i>	This work
EG94	Ter-1 intrRASC <i>dam</i> :: <i>cat</i>	This work
<i>ftsK</i>	FX98 ΔLC ::kan	Gift from FX Barre
EG95	Ori-3 interSC <i>ftsK</i> :: <i>cat</i>	This work
EG96	Ter-dif interSC <i>ftsK</i> :: <i>cat</i>	This work
EG97	Ori-3 intrRASC <i>ftsK</i> :: <i>cat</i>	This work
EG98	Ter-dif intrRASC <i>ftsK</i> :: <i>cat</i>	This work
RB01	MG1656 <i>yoaC</i> :: <i>loxP xxx</i> :: <i>loxP dnaCts</i>	This work
EG99	Ter-1 <i>lacloxP1</i>	This work
EG100	Ter-1 <i>lacloxP1 pMEVloxP</i>	This work
<i>recN</i>	<i>recN</i> :: <i>cat</i>	Keio collect
EG101	Ori-3 interSC <i>recN</i> :: <i>cat</i>	This work
EG102	Ori-3 intrRASC <i>recN</i> :: <i>cat</i>	This work

Plasmid	Description	Reference
pLexTopoIV	<i>parC</i> and <i>parE</i> genes into pLex5BA	Espeli et al ,2003
pETTopoIV	<i>parC</i> and <i>parE</i> genes into pET3c	Peng and Mariani, 1993
pMEV241	1 <i>loxP</i> site into pFX465	Gift from FX Barre
pMEVloxP	Derived from pMEV241 without Spec ^R by XmnI digestion	This work

Pour les observations au microscope des cellules vivantes, les souches sont cultivées en milieu minimum complété avec 0,1% d'acides casaminés et 0,2% de glycérol. Après concentration, 20µl de cellules sont déposés sur une lame recouverte par une couche de milieu minimum (0,1% acides casaminés, 0,2% glycérol) contenant 1% d'agarose. Les lames sont recouvertes d'une lamelle et scellées par un mélange de paraffine, lanoline et vaseline. L'observation est réalisée sur un microscope Zeiss axioobserver inversé, équipé d'une lampe sodium halide ou d'une lampe à LED et d'une camera EM-CCD Evolve Roper.

- Test *lacloxP* par PCR sur cellules synchronisées

Pour la synchronisation de la réplication les souches *dnaCts* sont cultivées en milieu minimum A complété avec 0,1% d'acides casaminés et 0,5% de succinate à 30°C (jusqu'à un DO600nm de 0,2).

Puis les souches *dnaCts* sont placées en culture dans un bain agitant à 40°C pendant 2 heures pour bloquer l'initiation de la réplication et permettre aux cellules de terminer le tour de réplication en cours. Enfin, pour ré-initier de manière synchrone la réplication, les cultures sont placées dans un bain agitant à 30°C pendant 10min. Pour inhiber d'autres initiations de la réplication, les cultures sont à nouveau placées dans un bain agitant à 40°C.

Pour tester de manière indépendante chaque étape de la synchronisation, plusieurs répliquas de 5ml de cultures sont effectués, traités de façon identique pour la synchronisation et de manière indépendante pour les tests de recombinaison.

Les tests *laclox* sont effectués à chaque étape de la synchronisation de manière indépendante avec une induction de 10min. Après induction 1 ml de culture est immédiatement congelé dans l'azote liquide, l'ADN génomique est extrait (Kit préparation d'ADN génomique Fermentas). 20 ng d'ADN génomique est utilisé comme matrice d'une PCR à 29 cycles.

A chaque étape, un échantillon de culture est prélevé, fixé avec de l'éthanol à 90%, Tris 10mM pH7,4 à 4°C. Après concentration des cellules et traitement à la RNase (10 µg/ml) pendant 20min, l'ADN est coloré à l'iodure de propidium (concentration finale entre 2 et 20 µg/ml) pour permettre de quantifier la quantité d'ADN présent dans les cellules par analyse au cytomètre de flux.

Table M2 : Oligonucleotides for Southern Blot experiments

Oligonucleotide	Sequence
Sonde lacZ up	TAACCACCACGTCATCGTA
Sonde lacZ do	GACGTCTCGTTGCTGCATAA
Sonde pMev up	CGCTGAACAAAACCTGGCCTT
Sonde pMev do	CAACGGTGGTATATCCAGTG

- Test lacloxP sur boîte

Les souches *lacloxP* sont transformées extemporanément par le plasmide pCRE. Les colonies obtenues sont striées sur milieu LB Xgal. Une préculture en LB spectinomycine (25 µg/ml) est effectuée. Les cultures de nuit sont diluées (à 1/100) en milieu minimum complémenté avec 0,1% d'acides casaminés et 0,2% de glycérol (ou 0,5% de succinate pour les tests en synchronisation) (jusqu'à DO600nm de 0,2). L'expression de Cre est induite en ajoutant de l'arabinose à 0,1% et l'induction est arrêtée après dilution à 10⁻⁴ de la culture dans du LB. Les cultures diluées sont étalées sur milieu LB solide contenant du X-gal (80 µg/ml) pour mesurer le ratio Lac⁺ / total de colonies.

- Révélation des précaténanes

Dans un premier temps, les sites *loxP* ont été insérés de manière indépendante aux positions X de la souche MG1656. Distant de 16 Mb, la recombinaison entre les deux sites *loxP* génère l'excision d'une région essentielle du chromosome. La mutation *dnaCts* est apportée par transduction via le phage P1.

La seconde construction est obtenue à partir d'une souche *lacloxP ::21 ::loxP* bleue, ayant subi une recombinaison *loxP* et ainsi ne possédant qu'un seul site *loxP* (*lacloxP1*). Puis, le plasmide pMEV*loxP* est inséré via son site *loxP* et la recombinase Cre dans la souche *lacloxP1*.

Les souches sont cultivées en milieu minimum A complémenté avec 0,1% d'acides casaminés et 0,2% de glycérol ou 0,5% de succinate, à 30°C (ou 40°C pour la synchronisation) (jusqu'à DO600nm de 0,2%). La recombinase Cre est induite pendant 6, 10 ou 16min. après induction, les cultures sont fixées par *flash freeze* dans l'azote liquide pour extraction de l'ADN génomique. Les événements de recombinaison sont observés par la méthode de Southern Blot après traitement de l'ADN génomique par des enzymes de restriction (*PstI* et *NcoI*), migration sur gel d'électrophorèse à 0,5% d'agarose, transfert alkalyne sur membrane de nylon et marquage des segments d'ADN d'intérêts par une sonde d'ADN radioactive amplifiée par l'intermédiaire des amorces Table M2.

- Surexpression de la TopoIV

Pour la surexpression de la TopoIV, nous avons utilisé les plasmides pLexTopoIV et pETTopoIV.

Pour le plasmide pET TopoIV, l'expression des sous unités ParC et ParE est constitutive (Peng and Mariani, 1993). Pour le plasmide pLexTopoIV, l'expression des sous unités ParC et ParE est induite par l'ajout d'IPTG (20 µg/ml). Les tests d'expression du plasmide pLexTopoIV sont observés par Western Blot avec l'utilisation d'anticorps anti-ParC ou anti-ParE produit dans des lapins (Espeli et al., 2003a).

Pour le test de recombinaison, les souches sont incubées préalablement avec 20 µg/ml d'IPTG pendant 20min avant induction de la recombinaison Cre en milieu minimum A complété avec 0,1% d'acides casaminés et 0,2% de glycérol à 30°C.

- Traitement à la mitomycine

Les souches sont traitées à la mitomycine C 0,1% pendant 30 ou 60min avant induction de la recombinaison Cre en milieu minimum A complété avec 0,1% d'acides casaminés et 0,2% de glycérol.

Bibliographie

Bibliographie

- Adachi, S., Fukushima, T., Hiraga, S., 2008. Dynamic events of sister chromosomes in the cell cycle of *Escherichia coli*. *Genes Cells* 13, 181–197.
- Adams, D.E., Shekhtman, E.M., Zechiedrich, E.L., Schmid, M.B., Cozzarelli, N.R., 1992. The role of topoisomerase IV in partitioning bacterial replicons and the structure of catenated intermediates in DNA replication. *Cell* 71, 277–288.
- Anderson, D.E., Losada, A., Erickson, H.P., Hirano, T., 2002. Condensin and cohesin display different arm conformations with characteristic hinge angles. *J. Cell Biol.* 156, 419–424.
- Aussel, L., Barre, F.X., Aroyo, M., Stasiak, A., Stasiak, A.Z., Sherratt, D., 2002. FtsK Is a DNA motor protein that activates chromosome dimer resolution by switching the catalytic state of the XerC and XerD recombinases. *Cell* 108, 195–205.
- Austin, S., Nordström, K., 1990. Partition-mediated incompatibility of bacterial plasmids. *Cell* 60, 351–354.
- Bach, T., Krekling, M.A., Skarstad, K., 2003. Excess SeqA prolongs sequestration of *oriC* and delays nucleoid segregation and cell division. *EMBO J.* 22, 315–323.
- Bach, T., Skarstad, K., 2004. Re-replication from non-sequesterable origins generates three-nucleoid cells which divide asymmetrically. *Mol. Microbiol.* 51, 1589–1600.
- 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.
- Baxter, J., Sen, N., Martínez, V.L., De Carandini, M.E.M., Schwartzman, J.B., Diffley, J.F.X., Aragón, L., 2011. Positive supercoiling of mitotic DNA drives decatenation by topoisomerase II in eukaryotes. *Science* 331, 1328–1332.
- Berger, J.M., Gamblin, S.J., Harrison, S.C., Wang, J.C., 1996. Structure and mechanism of DNA topoisomerase II. *Nature* 379, 225–232.
- Berkmen, M.B., Grossman, A.D., 2006. Spatial and temporal organization of the *Bacillus subtilis* replication cycle. *Mol. Microbiol.* 62, 57–71.
- Bermejo, R., Branzei, D., Foiani, M., 2008. Cohesion by topology: sister chromatids interlocked by DNA. *Genes Dev.* 22, 2297–2301.
- Bernhardt, T.G., De Boer, P.A.J., 2005. SlmA, a nucleoid-associated, FtsZ binding protein

required for blocking septal ring assembly over Chromosomes in *E. coli*. *Mol. Cell* 18, 555–564.

Bigot, S., Mariani, K.J., 2010. DNA chirality-dependent stimulation of topoisomerase IV activity by the C-terminal AAA+ domain of FtsK. *Nucleic Acids Res.* 38, 3031–3040.

Bigot, S., Saleh, O.A., Lesterlin, C., Pages, C., El Karoui, M., Dennis, C., Grigoriev, M., Allemand, J.-F., Barre, F.-X., Cornet, F., 2005. KOPS: DNA motifs that control *E. coli* chromosome segregation by orienting the FtsK translocase. *EMBO J.* 24, 3770–3780.

Bigot, S., Sivanathan, V., Possoz, C., Barre, F.-X., Cornet, F., 2007. FtsK, a literate chromosome segregation machine. *Mol. Microbiol.* 64, 1434–1441.

Blattner, F.R., Plunkett, G., 3rd, Bloch, C.A., Perna, N.T., Burland, V., Riley, M., Collado-Vides, J., Glasner, J.D., Rode, C.K., Mayhew, G.F., Gregor, J., Davis, N.W., Kirkpatrick, H.A., Goeden, M.A., Rose, D.J., Mau, B., Shao, Y., 1997. The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science* 277, 1453–1462.

Bliska, J.B., Cozzarelli, N.R., 1987. Use of site-specific recombination as a probe of DNA structure and metabolism in vivo. *J. Mol. Biol.* 194, 205–218.

Boles, T.C., White, J.H., Cozzarelli, N.R., 1990. Structure of plectonemically supercoiled DNA. *J. Mol. Biol.* 213, 931–951.

Bouet, J.-Y., Nordström, K., Lane, D., 2007. Plasmid partition and incompatibility--the focus shifts. *Mol. Microbiol.* 65, 1405–1414.

Brézellec, P., Hoebeke, M., Hiet, M.-S., Pasek, S., Ferat, J.-L., 2006. DomainSieve: a protein domain-based screen that led to the identification of dam-associated genes with potential link to DNA maintenance. *Bioinformatics* 22, 1935–1941.

Britton, R.A., Lin, D.C., Grossman, A.D., 1998. Characterization of a prokaryotic SMC protein involved in chromosome partitioning. *Genes Dev.* 12, 1254–1259.

Cejka, P., Plank, J.L., Dombrowski, C.C., Kowalczykowski, S.C., 2012. Decatenation of DNA by the *S. cerevisiae* Sgs1-Top3-Rmi1 and RPA Complex: A Mechanism for Disentangling Chromosomes. *Mol. Cell* 47, 886–896.

Champoux, J.J., 2001. DNA topoisomerases: structure, function, and mechanism. *Annu. Rev. Biochem.* 70, 369–413.

Cho, H., McManus, H.R., Dove, S.L., Bernhardt, T.G., 2011. Nucleoid occlusion factor SlmA

is a DNA-activated FtsZ polymerization antagonist. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108, 3773–3778.

Cooper, S., 2006. Regulation of DNA synthesis in bacteria: Analysis of the Bates/Kleckner licensing/initiation-mass model for cell cycle control. *Mol. Microbiol.* 62, 303–307.

Cooper, S., Helmstetter, C.E., 1968. Chromosome replication and the division cycle of *Escherichia coli* B/r. *J. Mol. Biol.* 31, 519–540.

Crisona, N.J., Strick, T.R., Bensimon, D., Croquette, V., Cozzarelli, N.R., 2000. Preferential relaxation of positively supercoiled DNA by *E. coli* topoisomerase IV in single-molecule and ensemble measurements. *Genes Dev.* 14, 2881–2892.

Cui, Y., Petrushenko, Z.M., Rybenkov, V.V., 2008. MukB acts as a macromolecular clamp in DNA condensation. *Nature Structural & Molecular Biology* 15, 411–418.

Danilova, O., Reyes-Lamothe, R., Pinskaya, M., Sherratt, D., Possoz, C., 2007. MukB colocalizes with the *oriC* region and is required for organization of the two *Escherichia coli* chromosome arms into separate cell halves. *Mol. Microbiol.* 65, 1485–1492.

Datsenko, K.A., Wanner, B.L., 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.

Deming, P.B., Flores, K.G., Downes, C.S., Paules, R.S., Kaufmann, W.K., 2002. ATR enforces the topoisomerase II-dependent G2 checkpoint through inhibition of Plk1 kinase. *J. Biol. Chem.* 277, 36832–36838.

DiGate, R.J., Marians, K.J., 1992. *Escherichia coli* topoisomerase III-catalyzed cleavage of RNA. *J. Biol. Chem.* 267, 20532–20535.

Donachie, W.D., 1968. Relationship between cell size and time of initiation of DNA replication. *Nature* 219, 1077–1079.

Dorsett, D., Ström, L., 2012. The ancient and evolving roles of cohesin in gene expression and DNA repair. *Curr. Biol.* 22, R240–250.

Downes, C.S., Clarke, D.J., Mullinger, A.M., Giménez-Abián, J.F., Creighton, A.M., Johnson, R.T., 1994. A topoisomerase II-dependent G2 cycle checkpoint in mammalian cells. *Nature* 372, 467–470.

Dubarry, N., Barre, F.-X., 2010. Fully efficient chromosome dimer resolution in *Escherichia coli* cells lacking the integral membrane domain of FtsK. *EMBO J.* 29, 597–605.

- Duggin, I.G., Wake, R.G., Bell, S.D., Hill, T.M., 2008. The replication fork trap and termination of chromosome replication. *Mol. Microbiol.* 70, 1323–1333.
- Dupaigne, P., Tonthat, N.K., Espéli, O., Whitfill, T., Boccard, F., 2012. Molecular basis for a protein-mediated DNA bridging mechanism that functions in long-range condensation of the *E. coli* chromosome. *Mol. Cell* in press.
- Elmore, S., Müller, M., Vischer, N., Odijk, T., Woldringh, C.L., 2005. Single-particle tracking of oriC-GFP fluorescent spots during chromosome segregation in *Escherichia coli*. *J. Struct. Biol.* 151, 275–287.
- Espéli, O., Borne, R., Dupaigne, P., Thiel, A., Gigant, E., Mercier, R., Boccard, F., 2012. A MatP-divisome interaction coordinates chromosome segregation with cell division in *E. coli*. *The EMBO journal*.
- Espeli, O., Lee, C., Marians, K.J., 2003a. A physical and functional interaction between *Escherichia coli* FtsK and topoisomerase IV. *J. Biol. Chem.* 278, 44639–44644.
- Espeli, O., Levine, C., Hassing, H., Marians, K.J., 2003b. Temporal regulation of topoisomerase IV activity in *E. coli*. *Mol. Cell* 11, 189–201.
- Espeli, O., Marians, K.J., 2004. Untangling intracellular DNA topology. *Mol. Microbiol.* 52, 925–931.
- Espeli, O., Mercier, R., Boccard, F., 2008. DNA dynamics vary according to macrodomain topography in the *E. coli* chromosome. *Mol. Microbiol.* 68, 1418–1427.
- Farcas, A.-M., Uluocak, P., Helmhart, W., Nasmyth, K., 2011. Cohesin's concatenation of sister DNAs maintains their intertwinning. *Mol. Cell* 44, 97–107.
- Fass, D., Bogden, C.E., Berger, J.M., 1999. Quaternary changes in topoisomerase II may direct orthogonal movement of two DNA strands. *Nat. Struct. Biol.* 6, 322–326.
- Fekete, R.A., Chatteraj, D.K., 2005. A cis-acting sequence involved in chromosome segregation in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 55, 175–183.
- Fossum, S., Crooke, E., Skarstad, K., 2007. Organization of sister origins and replisomes during multifork DNA replication in *Escherichia coli*. *EMBO J.* 26, 4514–4522.
- French, S., 1992. Consequences of replication fork movement through transcription units in vivo. *Science* 258, 1362–1365.
- Gellert, M., O'Dea, M.H., Itoh, T., Tomizawa, J., 1976. Novobiocin and coumermycin inhibit

DNA supercoiling catalyzed by DNA gyrase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 73, 4474–4478.

Giménez-Abián, J.F., Clarke, D.J., Giménez-Martín, G., Weingartner, M., Giménez-Abián, M.I., Carballo, J.A., Díaz de la Espina, S.M., Bögre, L., De la Torre, C., 2002. DNA catenations that link sister chromatids until the onset of anaphase are maintained by a checkpoint mechanism. *Eur. J. Cell Biol.* 81, 9–16.

Goehring, N.W., Gueiros-Filho, F., Beckwith, J., 2005. Premature targeting of a cell division protein to midcell allows dissection of divisome assembly in *Escherichia coli*. *Genes Dev.* 19, 127–137.

Gordon, G.S., Sitnikov, D., Webb, C.D., Teleman, A., Straight, A., Losick, R., Murray, A.W., Wright, A., 1997. Chromosome and low copy plasmid segregation in *E. coli*: visual evidence for distinct mechanisms. *Cell* 90, 1113–1121.

Gordon, S., Rech, J., Lane, D., Wright, A., 2004. Kinetics of plasmid segregation in *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology* 51, 461–469.

Graumann, P.L., Losick, R., Strunnikov, A.V., 1998. Subcellular localization of *Bacillus subtilis* SMC, a protein involved in chromosome condensation and segregation. *J. Bacteriol.* 180, 5749–5755.

Grompone, G., Ehrlich, S.D., Michel, B., 2003. Replication restart in *gyrB* *Escherichia coli* mutants. *Mol. Microbiol.* 48, 845–854.

Gruber, S., Errington, J., 2009. Recruitment of condensin to replication origin regions by ParB/SpoOJ promotes chromosome segregation in *B. subtilis*. *Cell* 137, 685–696.

Guacci, V., Koshland, D., Strunnikov, A., 1997. A direct link between sister chromatid cohesion and chromosome condensation revealed through the analysis of MCD1 in *S. cerevisiae*. *Cell* 91, 47–57.

Guarné, A., Brendler, T., Zhao, Q., Ghirlando, R., Austin, S., Yang, W., 2005. Crystal structure of a SeqA–N filament: implications for DNA replication and chromosome organization. *The EMBO Journal* 24, 1502–1511.

Haering, C.H., Löwe, J., Hochwagen, A., Nasmyth, K., 2002. Molecular architecture of SMC proteins and the yeast cohesin complex. *Mol. Cell* 9, 773–788.

Han, J.S., Kang, S., Lee, H., Kim, H.K., Hwang, D.S., 2003. Sequential binding of SeqA to paired hemi-methylated GATC sequences mediates formation of higher order complexes. *J.*

Biol. Chem. 278, 34983–34989.

Hatano, T., Niki, H., 2010. Partitioning of P1 plasmids by gradual distribution of the ATPase ParA. *Mol. Microbiol.* 78, 1182–1198.

Hayama, R., Mariani, K.J., 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.

Heck, M.M., Hittelman, W.N., Earnshaw, W.C., 1988. Differential expression of DNA topoisomerases I and II during the eukaryotic cell cycle. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85, 1086–1090.

Helmstetter, C.E., 1996. Timing of synthetic activities in the cell cycle, in: *In Escherichia Coli and Salmonella*. Neidhardt, F.C., J.L. Ingraham, E.C.C. Lin, K.B. Low, B. Magasanik, W.S. Reznikoff, M. Riley, M. Schaechter, and H.E. Umbarger, pp.

Hiasa, H., Mariani, K.J., 1996. Two distinct modes of strand unlinking during theta-type DNA replication. *J. Biol. Chem.* 271, 21529–21535.

Hiraga, S., 2000. Dynamic localization of bacterial and plasmid chromosomes. *Annu. Rev. Genet.* 34, 21–59.

Hiraga, S., Niki, H., Ogura, T., Ichinose, C., Mori, H., Ezaki, B., Jaffé, A., 1989. Chromosome partitioning in *Escherichia coli*: novel mutants producing anucleate cells. *J. Bacteriol.* 171, 1496–1505.

Hirano, M., Anderson, D.E., Erickson, H.P., Hirano, T., 2001. Bimodal activation of SMC ATPase by intra- and inter-molecular interactions. *EMBO J.* 20, 3238–3250.

Hirano, M., Hirano, T., 2004. Positive and negative regulation of SMC-DNA interactions by ATP and accessory proteins. *EMBO J.* 23, 2664–2673.

Hirano, T., 2002. The ABCs of SMC proteins: two-armed ATPases for chromosome condensation, cohesion, and repair. *Genes Dev.* 16, 399–414.

Hirano, T., 2005. Condensins: organizing and segregating the genome. *Curr. Biol.* 15, R265–275.

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.

- Holm, C., Stearns, T., Botstein, D., 1989. DNA topoisomerase II must act at mitosis to prevent nondisjunction and chromosome breakage. *Mol. Cell. Biol.* 9, 159–168.
- Holmes, V.F., Cozzarelli, N.R., 2000. Closing the ring: links between SMC proteins and chromosome partitioning, condensation, and supercoiling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97, 1322–1324.
- Ip, S.C.Y., Bregu, M., Barre, F.-X., Sherratt, D.J., 2003. Decatenation of DNA circles by FtsK-dependent Xer site-specific recombination. *EMBO J.* 22, 6399–6407.
- Jensen, R.B., Gerdes, K., 1999. Mechanism of DNA segregation in prokaryotes: ParM partitioning protein of plasmid R1 co-localizes with its replicon during the cell cycle. *EMBO J.* 18, 4076–4084.
- Jensen, R.B., Lurz, R., Gerdes, K., 1998. Mechanism of DNA segregation in prokaryotes: replicon pairing by parC of plasmid R1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95, 8550–8555.
- Johnson, R. C., Johnson, L. M., Schmidt, J. W., J F Gardner, 2005. Major nucleoid proteins in the structure and function of the Escherichia coli chromosome, in: *The Bacterial Chromosome*. N. Patrick Higgins.
- Joshi, M.C., Bourniquel, A., Fisher, J., Ho, B.T., Magnan, D., Kleckner, N., Bates, D., 2011. Escherichia coli sister chromosome separation includes an abrupt global transition with concomitant release of late-splitting intersister snaps. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108, 2765–2770.
- Kang, S., Han, J.S., Park, J.H., Skarstad, K., Hwang, D.S., 2003. SeqA protein stimulates the relaxing and decatenating activities of topoisomerase IV. *J. Biol. Chem.* 278, 48779–48785.
- Kato, J., Nishimura, Y., Yamada, M., Suzuki, H., Hirota, Y., 1988. Gene organization in the region containing a new gene involved in chromosome partition in Escherichia coli. *J. Bacteriol.* 170, 3967–3977.
- Kato, J., Suzuki, H., Ikeda, H., 1992. Purification and characterization of DNA topoisomerase IV in Escherichia coli. *J. Biol. Chem.* 267, 25676–25684.
- Kennedy, S.P., Chevalier, F., Barre, F.-X., 2008. Delayed activation of Xer recombination at dif by FtsK during septum assembly in Escherichia coli. *Mol. Microbiol.* 68, 1018–1028.
- Khodursky, A.B., Peter, B.J., Schmid, M.B., DeRisi, J., Botstein, D., Brown, P.O., Cozzarelli, N.R., 2000. Analysis of topoisomerase function in bacterial replication fork movement: use of

DNA microarrays. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97, 9419–9424.

Khodursky, A.B., Zechiedrich, E.L., Cozzarelli, N.R., 1995. Topoisomerase IV is a target of quinolones in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92, 11801–11805.

Kidane, D., Sanchez, H., Alonso, J.C., Graumann, P.L., 2004. Visualization of DNA double-strand break repair in live bacteria reveals dynamic recruitment of *Bacillus subtilis* RecF, RecO and RecN proteins to distinct sites on the nucleoids. *Molecular Microbiology* 52, 1627–1639.

Koshland, D., Hartwell, L.H., 1987. The structure of sister minichromosome DNA before anaphase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Science* 238, 1713–1716.

Lemon, K.P., Grossman, A.D., 1998. Localization of bacterial DNA polymerase: evidence for a factory model of replication. *Science* 282, 1516–1519.

Lemon, K.P., Grossman, A.D., 2000. Movement of replicating DNA through a stationary replisome. *Mol. Cell* 6, 1321–1330.

Lengronne, A., Katou, Y., Mori, S., Yokobayashi, S., Kelly, G.P., Itoh, T., Watanabe, Y., Shirahige, K., Uhlmann, F., 2004. Cohesin relocation from sites of chromosomal loading to places of convergent transcription. *Nature* 430, 573–578.

Lengronne, A., McIntyre, J., Katou, Y., Kanoh, Y., Hopfner, K.-P., Shirahige, K., Uhlmann, F., 2006. Establishment of Sister Chromatid Cohesion at the *S. cerevisiae* Replication Fork. *Molecular Cell* 23, 787–799.

Lesterlin, C., Gigant, E., Boccard, F., Espéli, O., 2012. Sister chromatid interactions in bacteria revealed by a site-specific recombination assay. *EMBO J.* 31, 3468–3479.

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, e1000288.

Levine, C., Mariani, K.J., 1998. Identification of *dnaX* as a high-copy suppressor of the conditional lethal and partition phenotypes of the *parE10* allele. *J. Bacteriol.* 180, 1232–1240.

Lewis, R.J., Singh, O.M., Smith, C.V., Skarzynski, T., Maxwell, A., Wonacott, A.J., Wigley, D.B., 1996. The nature of inhibition of DNA gyrase by the coumarins and the cyclothialidines revealed by X-ray crystallography. *EMBO J.* 15, 1412–1420.

Li, Y., Austin, S., 2002. The P1 plasmid in action: time-lapse photomicroscopy reveals some

unexpected aspects of plasmid partition. *Plasmid* 48, 174–178.

Li, Y., Dabrazhynetskaya, A., Youngren, B., Austin, S., 2004. The role of Par proteins in the active segregation of the P1 plasmid. *Mol. Microbiol.* 53, 93–102.

Li, Y., Sergueev, K., Austin, S., 2002. The segregation of the *Escherichia coli* origin and terminus of replication. *Mol. Microbiol.* 46, 985–996.

Li, Y., Stewart, N.K., Berger, A.J., Vos, S., Schoeffler, A.J., Berger, J.M., Chait, B.T., Oakley, M.G., 2010. *Escherichia coli* condensin MukB stimulates topoisomerase IV activity by a direct physical interaction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107, 18832–18837.

Li, Y., Youngren, B., Sergueev, K., Austin, S., 2003. Segregation of the *Escherichia coli* chromosome terminus. *Mol. Microbiol.* 50, 825–834.

Liu, L.F., Wang, J.C., 1987. Supercoiling of the DNA template during transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 84, 7024–7027.

Lucas, I., Germe, T., Chevrier-Miller, M., Hyrien, O., 2001. Topoisomerase II can unlink replicating DNA by precatenane removal. *EMBO J.* 20, 6509–6519.

Luijsterburg, M.S., Noom, M.C., Wuite, G.J.L., Dame, R.T., 2006. The architectural role of nucleoid-associated proteins in the organization of bacterial chromatin: a molecular perspective. *J. Struct. Biol.* 156, 262–272.

Madabhushi, R., Mariani, K.J., 2009. Actin homolog MreB affects chromosome segregation by regulating topoisomerase IV in *Escherichia coli*. *Mol. Cell* 33, 171–180.

Mascarenhas, J., Sanchez, H., Tadesse, S., Kidane, D., Krisnamurthy, M., Alonso, J.C., Graumann, P.L., 2006. *Bacillus subtilis* SbcC protein plays an important role in DNA inter-strand cross-link repair. *BMC Mol. Biol.* 7, 20.

Mason, D.J., Powelson, D.M., 1956. Nuclear division as observed in live bacteria by a new technique. *J. Bacteriol.* 71, 474–479.

Melby, T.E., Ciampaglio, C.N., Briscoe, G., Erickson, H.P., 1998. The symmetrical structure of structural maintenance of chromosomes (SMC) and MukB proteins: long, antiparallel coiled coils, folded at a flexible hinge. *J. Cell Biol.* 142, 1595–1604.

Mercier, R., Petit, M.-A., Schbath, S., Robin, S., El Karoui, M., Boccard, F., Espéli, O., 2008. The MatP/matS site-specific system organizes the terminus region of the *E. coli* chromosome into a macrodomain. *Cell* 135, 475–485.

- Misulovin, Z., Schwartz, Y.B., Li, X.-Y., Kahn, T.G., Gause, M., MacArthur, S., Fay, J.C., Eisen, M.B., Pirrotta, V., Biggin, M.D., Dorsett, D., 2008. Association of cohesin and Nipped-B with transcriptionally active regions of the *Drosophila melanogaster* genome. *Chromosoma* 117, 89–102.
- Moriya, S., Tsujikawa, E., Hassan, A.K., Asai, K., Kodama, T., Ogasawara, N., 1998. A *Bacillus subtilis* gene-encoding protein homologous to eukaryotic SMC motor protein is necessary for chromosome partition. *Mol. Microbiol.* 29, 179–187.
- Murray, A.W., Szostak, J.W., 1985. Chromosome segregation in mitosis and meiosis. *Annu. Rev. Cell Biol.* 1, 289–315.
- Nasmyth, K., 2005. How might cohesin hold sister chromatids together? *Philos. Trans. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci.* 360, 483–496.
- Nasmyth, K., Haering, C.H., 2009. Cohesin: its roles and mechanisms. *Annu. Rev. Genet.* 43, 525–558.
- Nielsen, H.J., Li, Y., Youngren, B., Hansen, F.G., Austin, S., 2006a. Progressive segregation of the *Escherichia coli* chromosome. *Mol. Microbiol.* 61, 383–393.
- Nielsen, H.J., Ottesen, J.R., Youngren, B., Austin, S.J., Hansen, F.G., 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., Youngren, B., Hansen, F.G., Austin, S., 2007. Dynamics of *Escherichia coli* chromosome segregation during multifork replication. *J. Bacteriol.* 189, 8660–8666.
- Niki, H., Hiraga, S., 1997. Subcellular distribution of actively partitioning F plasmid during the cell division cycle in *E. coli*. *Cell* 90, 951–957.
- Niki, H., Hiraga, S., 1998. Polar localization of the replication origin and terminus in *Escherichia coli* nucleoids during chromosome partitioning. *Genes Dev.* 12, 1036–1045.
- Niki, H., Imamura, R., Kitaoka, M., Yamanaka, K., Ogura, T., Hiraga, S., 1992. *E. coli* MukB protein involved in chromosome partition forms a homodimer with a rod-and-hinge structure having DNA binding and ATP/GTP binding activities. *EMBO J.* 11, 5101–5109.
- Niki, H., Jaffé, A., Imamura, R., Ogura, T., Hiraga, S., 1991. The new gene mukB codes for a 177 kd protein with coiled-coil domains involved in chromosome partitioning of *E. coli*. *EMBO J.* 10, 183–193.

- Niki, H., Yamaichi, Y., Hiraga, S., 2000. Dynamic organization of chromosomal DNA in *Escherichia coli*. *Genes Dev.* 14, 212–223.
- Ohsumi, K., Yamazoe, M., Hiraga, S., 2001. Different localization of SeqA-bound nascent DNA clusters and MukF-MukE-MukB complex in *Escherichia coli* cells. *Mol. Microbiol.* 40, 835–845.
- Peng, H., Marians, K.J., 1993. *Escherichia coli* topoisomerase IV. Purification, characterization, subunit structure, and subunit interactions. *J. Biol. Chem.* 268, 24481–24490.
- Peng, H., Marians, K.J., 1995. The interaction of *Escherichia coli* topoisomerase IV with DNA. *J. Biol. Chem.* 270, 25286–25290.
- Perez-Cheeks, B.A., Lee, C., Hayama, R., Marians, K.J., 2012. A role for topoisomerase III in *Escherichia coli* chromosome segregation. *Mol. Microbiol.*
- Peter, B.J., Arsuaga, J., Breier, A.M., Khodursky, A.B., Brown, P.O., Cozzarelli, N.R., 2004. Genomic transcriptional response to loss of chromosomal supercoiling in *Escherichia coli*. *Genome Biol.* 5, R87.
- Peter, B.J., Ullsperger, C., Hiasa, H., Marians, K.J., Cozzarelli, N.R., 1998. The structure of supercoiled intermediates in DNA replication. *Cell* 94, 819–827.
- Petrushenko, Z.M., Lai, C.-H., Rai, R., Rybenkov, V.V., 2006. DNA reshaping by MukB. Right-handed knotting, left-handed supercoiling. *J. Biol. Chem.* 281, 4606–4615.
- Petrushenko, Z.M., She, W., Rybenkov, V.V., 2011. A new family of bacterial condensins. *Mol. Microbiol.* 81, 881–896.
- Possoz, C., Filipe, S.R., Grainge, I., Sherratt, D.J., 2006. Tracking of controlled *Escherichia coli* replication fork stalling and restart at repressor-bound DNA in vivo. *EMBO J.* 25, 2596–2604.
- Possoz, C., Junier, I., Espeli, O., 2012. Bacterial chromosome segregation. *Front. Biosci.* 17, 1020–1034.
- Postow, L., Peter, B.J., Cozzarelli, N.R., 1999. Knot what we thought before: the twisted story of replication. *Bioessays* 21, 805–808.
- Rahmouni, A.R., Wells, R.D., 1992. Direct evidence for the effect of transcription on local DNA supercoiling in vivo. *J. Mol. Biol.* 223, 131–144.

- Reyes, E.D., Patidar, P.L., Uranga, L.A., Bortoletto, A.S., Lusetti, S.L., 2010. RecN is a cohesin-like protein that stimulates intermolecular DNA interactions in vitro. *J. Biol. Chem.* 285, 16521–16529.
- Reyes-Lamothe, R., Possoz, C., Danilova, O., Sherratt, D.J., 2008. Independent positioning and action of *Escherichia coli* replisomes in live cells. *Cell* 133, 90–102.
- Roca, J., Wang, J.C., 1996. The probabilities of supercoil removal and decatenation by yeast DNA topoisomerase II. *Genes Cells* 1, 17–27.
- Rocha, E.P.C., 2004. Order and disorder in bacterial genomes. *Curr. Opin. Microbiol.* 7, 519–527.
- Rocha, E.P.C., 2008. The organization of the bacterial genome. *Annu. Rev. Genet.* 42, 211–233.
- Rocha, E.P.C., Danchin, A., 2003. Gene essentiality determines chromosome organisation in bacteria. *Nucleic Acids Res.* 31, 6570–6577.
- Rodríguez, A.C., Stock, D., 2002. Crystal structure of reverse gyrase: insights into the positive supercoiling of DNA. *EMBO J.* 21, 418–426.
- Sanchez, H., Alonso, J.C., 2005. *Bacillus subtilis* RecN binds and protects 3'-single-stranded DNA extensions in the presence of ATP. *Nucleic Acids Res.* 33, 2343–2350.
- Sawitzke, J.A., Austin, S., 2000. Suppression of chromosome segregation defects of *Escherichia coli* muk mutants by mutations in topoisomerase I. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97, 1671–1676.
- Schneider, R., Lurz, R., Lüder, G., Tolksdorf, C., Travers, A., Muskhelishvili, G., 2001. An architectural role of the *Escherichia coli* chromatin protein FIS in organising DNA. *Nucleic Acids Res.* 29, 5107–5114.
- Seitan, V.C., Merkschlager, M., 2012. Cohesin and chromatin organisation. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 22, 93–100.
- Sinden, R.R., Pettijohn, D.E., 1981. Chromosomes in living *Escherichia coli* cells are segregated into domains of supercoiling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 78, 224–228.
- Skarstad, K., Boye, E., Steen, H.B., 1986. Timing of initiation of chromosome replication in individual *Escherichia coli* cells. *EMBO J.* 5, 1711–1717.
- Staczek, P., Higgins, N.P., 1998. Gyrase and Topo IV modulate chromosome domain size in

vivo. *Mol. Microbiol.* 29, 1435–1448.

Strunnikov, A.V., Larionov, V.L., Koshland, D., 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.

Sueoka, N., Yoshikawa, H., 1965. The chromosome of *Bacillus subtilis*. I. Theory of marker frequency analysis. *Genetics* 52, 747–757.

Sullivan, N.L., Marquis, K.A., Rudner, D.Z., 2009. Recruitment of SMC by ParB-parS organizes the origin region and promotes efficient chromosome segregation. *Cell* 137, 697–707.

Sunako, Y., Onogi, T., Hiraga, S., 2001. Sister chromosome cohesion of *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 42, 1233–1241.

Sundin, O., Varshavsky, A., 1981. Arrest of segregation leads to accumulation of highly intertwined catenated dimers: dissection of the final stages of SV40 DNA replication. *Cell* 25, 659–669.

Suski, C., Marians, K.J., 2008. Resolution of converging replication forks by RecQ and topoisomerase III. *Mol. Cell* 30, 779–789.

Tanaka, T.U., 2002. Bi-orienting chromosomes on the mitotic spindle. *Curr. Opin. Cell Biol.* 14, 365–371.

Terret, M.-E., Sherwood, R., Rahman, S., Qin, J., Jallepalli, P.V., 2009. Cohesin acetylation speeds the replication fork. *Nature* 462, 231–234.

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

Uhlmann, F., 2004. The mechanism of sister chromatid cohesion. *Exp. Cell Res.* 296, 80–85.

Ullsperger, C., Cozzarelli, N.R., 1996. Contrasting enzymatic activities of topoisomerase IV and DNA gyrase from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 271, 31549–31555.

Val, M.-E., Kennedy, S.P., El Karoui, M., Bonn e, L., Chevalier, F., Barre, F.-X., 2008. FtsK-dependent dimer resolution on multiple chromosomes in the pathogen *Vibrio cholerae*. *PLoS Genet.* 4, e1000201.

Valens, M., Penaud, S., Rossignol, M., Cornet, F., Boccard, F., 2004. Macrodomain

organization of the *Escherichia coli* chromosome. *EMBO J.* 23, 4330–4341.

Vaur, S., Feytout, A., Vazquez, S., Javerzat, J.-P., 2012. Pds5 promotes cohesin acetylation and stable cohesin-chromosome interaction. *EMBO Rep.* 13, 645–652.

Von Freiesleben, U., Krekling, M.A., Hansen, F.G., Løbner-Olesen, A., 2000. The eclipse period of *Escherichia coli*. *EMBO J.* 19, 6240–6248.

Walker, G. C., 1996. The SOS response of *Escherichia coli*, in: *Escherichia Coli and Salmonella Cellular and Molecular Biology*. Neidhardt, F. C., p. 1400–1416.

Wang, J.C., 1984. DNA supercoiling and its effects on the structure of DNA. *J. Cell Sci. Suppl.* 1, 21–29.

Wang, J.C., 1985. DNA topoisomerases. *Annu. Rev. Biochem.* 54, 665–697.

Wang, J.C., 2002. Cellular roles of DNA topoisomerases: a molecular perspective. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 3, 430–440.

Wang, L.H.-C., Mayer, B., Stemmann, O., Nigg, E.A., 2010. Centromere DNA decatenation depends on cohesin removal and is required for mammalian cell division. *J. Cell. Sci.* 123, 806–813.

Wang, X., Liu, X., Possoz, C., Sherratt, D.J., 2006. The two *Escherichia coli* chromosome arms locate to separate cell halves. *Genes Dev.* 20, 1727–1731.

Wang, X., Possoz, C., Sherratt, D.J., 2005. Dancing around the divisome: asymmetric chromosome segregation in *Escherichia coli*. *Genes Dev.* 19, 2367–2377.

Wang, X., Reyes-Lamothe, R., Sherratt, D.J., 2008. Modulation of *Escherichia coli* sister chromosome cohesion by topoisomerase IV. *Genes Dev.* 22, 2426–2433.

Weitao, T., Dasgupta, S., Nordström, K., 2000a. Role of the mukB gene in chromosome and plasmid partition in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 38, 392–400.

Weitao, T., Nordström, K., Dasgupta, S., 1999. Mutual suppression of mukB and seqA phenotypes might arise from their opposing influences on the *Escherichia coli* nucleoid structure. *Mol. Microbiol.* 34, 157–168.

Weitao, T., Nordström, K., Dasgupta, S., 2000b. *Escherichia coli* cell cycle control genes affect chromosome superhelicity. *EMBO Rep.* 1, 494–499.

White, M.A., Eykelenboom, J.K., Lopez-Vernaza, M.A., Wilson, E., Leach, D.R.F., 2008. Non-random segregation of sister chromosomes in *Escherichia coli*. *Nature* 455, 1248–1250.

- Wiggins, P.A., Cheveralls, K.C., Martin, J.S., Lintner, R., Kondev, J., 2010. Strong intranucleoid interactions organize the *Escherichia coli* chromosome into a nucleoid filament. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107, 4991–4995.
- Woldringh, C.L., Mulder, E., Huls, P.G., Vischer, N., 1991. Toporegulation of bacterial division according to the nucleoid occlusion model. *Res. Microbiol.* 142, 309–320.
- Wu, L.J., Errington, J., 2004. Coordination of cell division and chromosome segregation by a nucleoid occlusion protein in *Bacillus subtilis*. *Cell* 117, 915–925.
- Wu, L.J., Ishikawa, S., Kawai, Y., Oshima, T., Ogasawara, N., Errington, J., 2009. Noc protein binds to specific DNA sequences to coordinate cell division with chromosome segregation. *EMBO J.* 28, 1940–1952.
- Yamaichi, Y., Niki, H., 2004. migS, a cis-acting site that affects bipolar positioning of oriC on the *Escherichia coli* chromosome. *EMBO J.* 23, 221–233.
- Yamanaka, K., Ogura, T., Niki, H., Hiraga, S., 1996. Identification of two new genes, mukE and mukF, involved in chromosome partitioning in *Escherichia coli*. *Mol. Gen. Genet.* 250, 241–251.
- Yamazoe, M., Adachi, S., Kanaya, S., Ohsumi, K., Hiraga, S., 2005. Sequential binding of SeqA protein to nascent DNA segments at replication forks in synchronized cultures of *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 55, 289–298.
- Yamazoe, M., Onogi, T., Sunako, Y., Niki, H., Yamanaka, K., Ichimura, T., Hiraga, S., 1999. Complex formation of MukB, MukE and MukF proteins involved in chromosome partitioning in *Escherichia coli*. *EMBO J.* 18, 5873–5884.
- Yu, X.C., Weihe, E.K., Margolin, W., 1998. Role of the C terminus of FtsK in *Escherichia coli* chromosome segregation. *J. Bacteriol.* 180, 6424–6428.
- Zechiedrich, E.L., Cozzarelli, N.R., 1995. Roles of topoisomerase IV and DNA gyrase in DNA unlinking during replication in *Escherichia coli*. *Genes Dev.* 9, 2859–2869.
- Zechiedrich, E.L., Khodursky, A.B., Bachellier, S., Schneider, R., Chen, D., Lilley, D.M., Cozzarelli, N.R., 2000. Roles of topoisomerases in maintaining steady-state DNA supercoiling in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 275, 8103–8113.
- Zechiedrich, E.L., Khodursky, A.B., Cozzarelli, N.R., 1997a. Topoisomerase IV, not gyrase, decatenates products of site-specific recombination in *Escherichia coli*. *Genes Dev.* 11, 2580–

2592.

Zechiedrich, E.L., Khodursky, A.B., Cozzarelli, N.R., 1997b. Topoisomerase IV, not gyrase, decatenates products of site-specific recombination in *Escherichia coli*. *Genes Dev.* 11, 2580–2592.