



HAL
open science

Étude de l'organisation et de la ségrégation du chromosome de *Pseudomonas aeruginosa*.

Valentine Lagage

► **To cite this version:**

Valentine Lagage. Étude de l'organisation et de la ségrégation du chromosome de *Pseudomonas aeruginosa*.. Bactériologie. Université Paris Saclay (COmUE), 2017. Français. NNT : 2017SACLS340 . tel-01661410

HAL Id: tel-01661410

<https://theses.hal.science/tel-01661410>

Submitted on 11 Dec 2017

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

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

THESE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITE PARIS-SACLAY
PREPAREE A L'UNIVERSITE PARIS-SUD

Ecole doctorale numéro 577 :
Structure et Dynamique des Systèmes Vivants (SDSV)
Spécialité Science et Vie de la santé

Par Valentine Lagage

Etude de l'organisation et de la ségrégation des chromosomes
chez *Pseudomonas aeruginosa*

Thèse présentée et soutenue le 16 Octobre 2017 à Gif-sur-Yvette

Composition du Jury :

Mr Jean-Yves BOUET : Directeur de recherche- CNRS Université de Toulouse	Rapporteur
Mr Marcelo NOLLMANN : Directeur de recherche-CNRS Montpellier	Rapporteur
Mme Olga SOUTOURINA : Professeur - I2BC Université Paris-Saclay	Présidente
Mme Marie-Eve VAL : Chargé de recherche- Institut Pasteur (Paris)	Examinatrice
Mr Frédéric BOCCARD : Directeur de recherche -I2BC Université Paris-Saclay	Examinateur
Mme Isabelle VALLET-GELY : Chargé de recherche - I2BC Université Paris-Saclay	Directrice de thèse

Numéro NNT : 2017SACLS340

REMERCIEMENTS

Je tiens pour commencer à remercier tous les membres de mon jury pour avoir accepté de consacrer du temps à mon travail de thèse. Les conseils et questions posées par chacun d'entre vous pendant ma soutenance de thèse m'ont beaucoup apporté et aidé alors merci beaucoup.

Merci aussi à Olivier Espeli pour avoir été mon tuteur de thèse pendant ces 3 années et Rut Carballido-Lopez et Marc Nadal pour avoir fait partie de mon comité de thèse.

Je voudrais continuer en remerciant d'abord Frédéric Boccard pour m'avoir accueillie dans son équipe, pour m'avoir fait confiance et m'avoir permis de réaliser ma thèse dans de très bonnes conditions.

Ensuite je voudrais remercier énormément Isabelle, ma responsable, pour avoir été aussi présente pour moi tous les jours pendant ces 3 années (et un peu plus même ;-)). Merci pour tout ce que tu m'as appris, tous tes conseils, ton aide, ta patience, ta grande gentillesse. Merci de m'avoir fait confiance aussi. Je suis ta première étudiante en thèse et si on me pose la question, je te recommanderais comme responsable sans hésitations.

Je voudrais aussi dire un treeees graaaannnd merci à tous les membres de l'équipe : Vicky, Stéphane, Julien et Michèle. Merci à tous pour votre aide, pour les discussions, pour toutes les rigolades, les pauses café et les bons moments passés ensemble. Merci Michèle pour ton aide et toutes les discussions. Merci Stéphane pour tes conseils, ta grande gentillesse et merci (ou pas ;-)) pour m'avoir autant « embêtée » gentiment. Merci Vicky et Julien pour nos « cafés des jeunes », pour tous vos conseils pour les manips et autres, et pour m'avoir écoutée quand j'en avais besoin, c'était vraiment super de vous avoir à mes cotés pendant cette thèse!

Merci aussi à toutes les équipes voisines, particulièrement les équipes Barre, Yamaichi, Michel, Noordermeer et Crabbe, pour les dépannages manips, pour les déjeuners ensemble, pour tous les bons moments partagés.... Et Merci aussi aux filles de la cuisine. Merci vraiment car il n'y a pas une aussi bonne ambiance dans tous les instituts et cela a aussi contribué à ce que ma thèse se passe très bien !

Je souhaite aussi remercier tous ceux qui ont participé de près ou de loin à l'association YOUR-I2BC. L'association m'a énormément apportée, que ça soit en organisant certains événements ou y participant ! Mention spéciale à Laurine et Charbel, merci d'avoir accepté d'y consacrer autant de temps !!

Je voudrais également remercier tous mes amis. D'abord ceux qui ont été là depuis le début (et même avant !). Merci Spécialement à Mathilde (pour nos textos depuis le lycée), à Maylis et à mes amies de Licence.

Je voudrais remercier aussi tout particulièrement ma « dream team », Gaby, Chloé, Marine, Camille, Jeff et Solal, merci pour toutes les soirées, les vacances inoubliables passées avec vous, votre soutien sans faille depuis le début, Merci d'être toujours là pour moi, vous êtes géniaux!!!

Merci aussi à tous ceux que j'ai rencontré pendant ma thèse et qui sont maintenant des amis. Un énoorme merci à mes deux chouettes Marie et Caroline, pour toutes ces sessions course à pied faites ensemble, pour avoir toujours été là depuis le début, pour m'avoir écoutée et reboostée quand j'en ai eu besoin =). Merci à Marine (pour nos courses à pied cette année aussi), Charbel, Michal, Ipek, Manon, Laura, Mahnaz, Laurine, Arthur, Julien, Vicky et tout ceux que j'oublie....pour m'avoir soutenue jusqu'au bout, pour les pauses cafés, pour nos soirées jeux de société, karaoké et tous les bons moments passés avec vous !

Enfin je voudrais remercier toute ma famille et particulièrement mes frères et leurs compagnes et bien-sûr mes parents pour m'avoir permis de réaliser cette thèse dans les meilleures conditions possibles, pour être toujours là pour moi, pour me chouchouter tous les jours, je vous aime fort !!

Ma thèse n'a pu se faire que grâce à votre aide à tous alors Merci !!

RESUME

Au moment de la division cellulaire, l'ADN contenu dans les chromosomes doit être transmis de la cellule mère à chacune des cellules filles. Pour cela l'ADN est d'abord copié (réplication de l'ADN) puis séparé (ségrégation des chromosomes) dans chacune des cellules filles. Chez les eucaryotes, cette séparation se fait lors de la mitose c'est à dire après que les chromosomes soient complètement répliqués. Chez les bactéries qui en général possède un unique chromosome circulaire, cette ségrégation du chromosome se fait au fur et à mesure de la réplication et deux grands types d'acteurs sont souvent impliqués dans ce processus : Les condensines bactériennes (de type SMC) et les systèmes de partition (ParABS).

Les systèmes de partition sont composés de deux protéines ParA et ParB et de séquences ADN spécifiquement reconnues par ParB nommées *parS*. Ces séquences sont en nombres variables selon les espèces et sont souvent localisées proches de l'origine de réplication (*oriC*) sur le chromosome. Pendant ma thèse, je me suis intéressée à l'importance de ces séquences et à l'importance de leur positionnement sur le chromosome chez *Pseudomonas aeruginosa*. J'ai pu montrer qu'un seul site *parS* suffit pour une ségrégation correcte du chromosome, s'il est situé dans une région s'étendant de -200 à + 450 kb autour d'*oriC*. Les limites de cette région appelée « zone de compétence » seraient liées à la distance *oriC-parS* et son asymétrie serait due à la présence de l'opéron ribosomique *rrnD* à 220 kb à gauche d'*oriC*. En plus de donner une meilleure compréhension de la ségrégation chez *P. aeruginosa*, cette partie du projet a permis de mettre en évidence un lien entre *oriC* et sites *parS* qui pourrait expliquer leurs localisations proches sur le chromosome.

Je me suis également intéressée au complexe SMC-ScpAB et à son rôle dans la ségrégation du chromosome chez *P. aeruginosa*. J'ai montré que si SMC n'a pas un rôle majeur dans la ségrégation du chromosome, il est important pour le positionnement du chromosome dans la cellule. J'ai aussi mis en évidence un lien entre SMC et le système ParABS en étudiant l'effet du déplacement d'un site *parS* sur l'organisation et la ségrégation du chromosome.

Mots clés : *Pseudomonas aeruginosa* – chromosome – ségrégation – système ParABS – condensines bactériennes

ABSTRACT

When a mother cell is dividing, DNA inside chromosomes needs to be transmitted to daughter cells. For that, the DNA is copied (replication) and the two copies are separated in each daughter cell (segregation). In eukaryotes this separation occurs during mitosis after complete replication of DNA. In a bacterium, which in general has a unique and circular chromosome, segregation occurs concomitantly with replication and two main actors are often involved in this segregation: SMC complexes and partition systems (ParABS).

A partition system contains 3 elements: two proteins ParA and ParB and DNA sequences named *parS*. These sequences are highly conserved and are found in variable numbers depending on bacteria. Their chromosomal localization is almost always close to *oriC*. During my thesis I worked on the importance of these sequences and on the importance of their chromosomal localization for the functioning of ParABS in *Pseudomonas aeruginosa*.

I have shown that one *parS* site is enough for correct chromosome segregation if it is located between -200 and +450 kb around *oriC*. Limits of this region called “zone de competence” are probably linked with the distance between *oriC-parS*. The asymmetry of the “competence zone” is probably due to the presence of a ribosomal operon (*rrnD*) at -220kb. This part of the project allows us to understand better chromosome segregation in *P. aeruginosa* but also to highlight a functional link between *oriC* and *parS* which can explain why these sequences are located close from each other on the chromosome in lots of bacteria.

I also studied the SMC-ScpAB complex and its role in chromosome segregation. For that I analyzed the conformation and segregation of a Δsmc mutant. I highlighted a link between SMC-ScpAB and ParABS system by characterization of mutants with *parS* displaced on the chromosome.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa* - Chromosome – Segregation – ParABS - bacterial condensins

SOMMAIRE

REMERCIEMENTS	3
RESUME	7
ABSTRACT	9
TABLE DES FIGURES	15
LISTE D'ABREVIATIONS	19
INTRODUCTION	23
1. Organisation des chromosomes	25
1.1. Les niveaux d'organisation des chromosomes eucaryotes	25
1.2 Les chromosomes bactériens : plusieurs niveaux d'organisation du chromosome.....	33
1.2.1 Organisation moléculaire	35
1.2.1.1. Le surenroulement de l'ADN	37
1.2.1.2 Protéines interagissant avec l'ADN	39
• NAP (Nucleoid Associated Proteins).....	39
• Les protéines de type SMC	43
1.2.1.3 Chromosomal Interaction Domains (CID)	53
1.2.1.4 Macrodomaines.....	55
1.2.2 Organisation spatiale.....	55
2. Ségrégation des chromosomes	59
2.1 Initiation de la ségrégation des chromosomes bactériens :.....	59
2.1.1. Ségrégation des origines chez les bactéries ayant un système de partition.....	61
2.1.1.1. Ségrégation des chromosomes bactérien - système de partition de type I.....	63
2.1.1.2. Un ancrage au pôle du chromosome pour certaines bactéries	81
2.1.2. Ségrégation des origines de réplication chez les bactéries sans système de partition... ..	83
2.2. Ségrégation de l'ensemble du chromosome	85
2.3. La terminaison de la ségrégation – division cellulaire.....	87
3. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	91
3.1. Un pathogène opportuniste	91
3.2. Organisation du chromosome et cycle cellulaire	93
3.3. Souche PAO1 du laboratoire	95
3.4. Problématiques de la thèse.....	95
RESULTATS	99
1. Article “Regional Control of Chromosome Segregation in <i>Pseudomonas aeruginosa</i>”	101

1.1. Résumé de l'article "Regional Control of Chromosome Segregation in <i>Pseudomonas aeruginosa</i> "	101
1.2 Article "Regional Control of Chromosome Segregation in <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	105
2. Etude du rôle de SMC-ScpAB et lien avec le système ParABS	107
2.1. Etude préliminaire effet de SMC-ScpAB sur la ségrégation	107
3. Synthèse / conclusions	129
DISCUSSION ET PERSPECTIVES	131
1 Processus de ségrégation des chromosomes	133
1.1. Fixation de ParB sur le chromosome.....	133
1.2. « Zone de compétence » de <i>parS</i>	135
1.3. Impact du déplacement d'un site <i>parS</i> sur le chromosome	137
1.4. Impact de la présence de deux <i>parS</i> éloigné sur le chromosome.....	139
2. Conformation, disposition et positionnement du chromosome.	141
MATERIEL ET METHODES	147
1. Matériels	149
1.1. Milieux :	149
1.2. Souches :	149
2. Méthodes :	153
2.1. Construction des souches :	153
2.2 Suivi de la croissance au cours du temps.	153
2.3 Marquage des cellules et coloration DAPI :	155
2.4. Etude de la position cellulaire du chromosome par microscopie.	155
2.5. Immunoprécipitation de la chromatine (ChIP).....	157
2.6 Transposition suivie d'un séquençage haut-débit (Tn-seq)	159
2.7 Capture de conformation chromosomique (3C-seq)	161
ANNEXES	165
BIBLIOGRAPHIE.....	174

TABLE DES FIGURES

Figure 1 : Compaction du chromosome eucaryote	26
Figure 2 : Organisation des chromosomes eucaryotes	26
Figure 3 Les protéines de types SMC (Structural Maintenance of Chromosome)	28
Figure 4: « Loop extrusion »	28
Figure 5: Boucles de chromatine via les cohésines et régulées par CTCF	28
Figure 6: phylogénie des chromosomes bactériens.....	32
Figure 7 Le nucléoïde coloré au Giemsa.....	32
Figure 8 Le chromosome bactérien circulaire.....	34
Figure 9: Supercoiling	36
Figure 10 : 4 exemple de NAPs (Nucleoid Associated Proteins)	40
Figure 11: Les condensines bactériennes.....	42
Figure 12 : Localisation de ScpB-YFP dans une souche WT et dans le mutant Δ spoOJ.....	42
Figure 13 : Modèle de recrutement de SMC-ScpAB sur l'ADN.....	44
Figure 14: Juxtaposition de l'ADN par SMC chez <i>C. crescentus</i>	44
Figure 15: SMC juxtapose l'ADN à partir de son site de chargement sur l'ADN	46
Figure 16: Modèles de fonctionnement de SMC chez <i>B. subtilis</i> et <i>C.crescentus</i>	48
Figure 17: Matrices de contacts de souches ayant un site <i>parS</i> déplacé chez <i>B. subtilis</i>	50
Figure 18: Visualisation des CIDs par Hi-C chez <i>C. crescentus</i>	50
Figure 19: Organisation du chromosome d' <i>E. coli</i> en macrodomaines	52
Figure 20: orientation longitudinale et transversale du chromosome	54
Figure 21: Différentes dynamiques de réplication selon l'orientation du chromosome.....	56
Figure 22: phylogénie du système ParABS	60
Figure 23: Structure de ParB	62
Figure 24: le système ParABS chez <i>C. crescentus</i>	62
Figure 25: modèle de "spreading" de ParB	66
Figure 26: Modèle de « nucleation and caging »	68
Figure 27: Schéma de la cellule d'écoulement utilisée pour reconstitué le système de partition du plasmide P1 in vitro.....	72
Figure 28: modèle du "diffusion-ratchet"	74
Figure 29: Le modèle du DNA-relay.....	76
Figure 30: le modèle du Hitch-hiking	78
Figure 31: ancrage du chromosome de <i>C. crescentus</i>	80
Figure 32: ancrage au pôle de <i>V. cholerae</i>	82
Figure 33: Modèle de l'ancrage du chromosome de <i>C. glutamicum</i>	84
Figure 34: Modèle pour la ségrégation chez <i>E.coli</i> qui ne possède pas de système ParABS.....	86
Figure 35: Problème possible en fin de ségrégation des chromosomes.....	86
Figure 36: Schéma du fonctionnement du système MinCDE chez <i>E.coli</i>	88
Figure 37: Modèle pour l'action de Noc (une des Nucleoid Occlusion Protein)	90
Figure 38 : FROS (Fluorescence Repressor-Operator System) ou suivi des localisations cellulaires par fluorescence et positions chromosomiques des étiquettes dont la localisation cellulaire a été étudiée.	90
Figure 39: Positionnement du chromosome de la souche PAO1 sauvage dans la cellule.....	92
Figure 40: Cycle cellulaire de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	94

Figure 41 : Représentation des étapes du 3C-seq et matrice WT <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	96
Figure 42 : Etude du positionnement global du chromosome chez un mutant Δsmc	108
Figure 43 : Pourcentages de cellules à deux foci en fonction de la taille des cellules chez le mutant Δsmc	109
Figure 44: Matrices de contacts de la souche PAO1 de <i>P. aeruginosa</i>	110
Figure 45: Matrices de contacts $\Delta parA$, $\Delta pars1234$, Δsmc	110
Figure 46: Etude du positionnement des bras du chromosome chez un mutant Δsmc	112
Figure 47: Positionnement des régions autour d' <i>oriC</i> et de <i>dif</i> dans la cellule.....	114
Figure 48: positionnement des bras du chromosome : microscopie double étiquette/3C-seq	116
Figure 49 : Ségrégation des souches ayant un <i>parS</i> déplacé sur le chromosome en contexte Δsmc . 116	
Figure 50 : Position globale du chromosome dans la cellule dans des souches ayant un site <i>parS</i> déplacé.	118
Figure 51 : Etude du positionnement cellulaire des bras du chromosome dans la souche $\Delta parS1234$ <i>parS</i> 552 kb	120
Figure 52 : Etude de l'initiation de la ségrégation dans le cas de la souche $\Delta parS1234$ <i>parS</i> 552 kb 122	
Figure 53 : Etude de l'initiation de la ségrégation dans le cas de la souche $\Delta parS123$ <i>parS</i> 552 kb .. 124	
Figure 54 : Positionnement des bras du chromosome dans la souche $\Delta parS123$ <i>parS</i> 552 kb.	126
Figure 55 : 3C-seq pour deux souches possédant deux sites <i>parS</i> distants.	127
Figure 56 : Ségrégation chez différentes souches qui comportent deux sites <i>parS</i> espacés sur le chromosome	128

LISTE D'ABREVIATIONS

- 3C** : Capture de Conformation Chromosomique
- 3D-SIM** : Structured illumination microscopy /éclairage structuré à trois dimensions
- ADN** : Acide DésoxyriboNucléique
- ATP**: Adénosine TriPhosphate
- C-Terminale** : Extrémité carboxy-terminale
- CFP** : Cyan Fluorescent Protein
- CID** : Chromosomal Interaction Domain –Domaine d’interactions chromosomiques
- DAPI**: 4',6-diamidino-2-phénylindole
- FROS** : Fluorescent Repressor Operateur System
- GFP** : Green Fluorescent Protein
- IPTG**: Isopropylthio- β -D- galactopyranoside
- Kb** : Kilobase
- Mb** : Mégabase
- MD** : Macrodomaine
- MM** : Milieu Minimum
- NAP** : Nucleoid Associated Protein – Protéine associée à l’ADN
- N-Terminale** : Extrémité amino-terminale
- Pb** : Paire de base
- SMC** : Structural Maintenance of Chromosome
- TAD** : Topological Associated Domain –Domaine associé à la topologie
- TIRFM**: Total internal reflection fluorescence microscope/ Microscope de fluorescence par réflexion totale interne

Dans ce manuscrit, je vais vous présenter mon travail de thèse qui a porté sur l'étude de l'organisation et de la ségrégation du chromosome bactérien. J'ai réalisé cette étude en utilisant des approches de génétique et de biologie moléculaire chez la bactérie *Pseudomonas aeruginosa*.

En introduction de ce manuscrit, je vais décrire les mécanismes déjà connus qui permettent à la longue molécule d'ADN d'être contenue (sous forme de chromosome) dans une cellule beaucoup plus petite que cette molécule, qu'est une bactérie. Je vais aussi détailler les processus permettant à l'ADN d'être présent dans chacune des cellules filles après la division cellulaire. Ces problématiques sont communes à tous les organismes, procaryotes comme eucaryotes. J'évoquerais également le cas des eucaryotes dans mon introduction. Ensuite, je présenterais les résultats que j'ai obtenus pendant ma thèse concernant la ségrégation du chromosome de la bactérie *P. aeruginosa* et je terminerais enfin par une discussion sur le sujet.

J'espère vous faire partager le plaisir de découvrir l'incroyable organisation de l'ADN bactérien, maintenue tout au long du cycle cellulaire, dans de si petites espèces que sont les bactéries.

INTRODUCTION

L'ADN (Acide Désoxyribonucléique), structuré en un ou plusieurs chromosome(s), est le support universel de l'information génétique pour tous les organismes. La taille de l'ADN contenu dans un chromosome excède très largement la taille d'une cellule. En effet, si l'ADN du plus petit chromosome humain était totalement linéaire, il aurait une taille de 14000 μm (1,4 cm) alors que la taille des cellules eucaryotes va de 10 à 100 μm . Cela est également vrai chez les procaryotes à des échelles de tailles différentes (taille du chromosome déplié de l'ordre du millimètre et taille de la cellule de l'ordre du micromètre). Le chromosome doit donc être compacté et organisé dans la cellule tout en permettant la réalisation des processus indispensables à la cellule (réplication, transcription...). Et il est également essentiel que l'ADN soit transmis intégralement et fidèlement aux cellules filles.

Les organismes eucaryotes possèdent plusieurs chromosomes contenus dans le noyau de chaque cellule. Si l'organisation de ces chromosomes est assez bien connue, les procaryotes beaucoup plus petits et ne possédant pas de noyau ont longtemps été considérés comme dépourvus d'organisation. Ce n'est que plus récemment, grâce à l'amélioration des techniques, et notamment des techniques de microscopies, que plusieurs niveaux d'organisation du chromosome bactérien ont été identifiés.

1. Organisation des chromosomes

1.1. Les niveaux d'organisation des chromosomes eucaryotes

Les études réalisées sur l'organisation des chromosomes eucaryotes ont permis de mettre en évidence plusieurs niveaux d'organisation via différents mécanismes. L'ADN s'enroule en effet autour de protéines pour former des nucléosomes. Ces nucléosomes sont contenus dans des domaines topologiques (TADs) qui seraient notamment formés à l'aide de protéines de type SMC. Ces TADs sont répartis entre compartiments A et B. Des équivalences de certains de ces niveaux ont été identifiées pour les chromosomes bactériens.

-Organisation en nucléosomes

Les eucaryotes possèdent plusieurs chromosomes localisés dans le noyau des cellules et composés majoritairement d'ADN et de protéines nommées histones autour desquelles s'enroule l'ADN. L'unité de base de l'organisation du chromosome eucaryote est le nucléosome composé d'un octamère d'histones autour desquelles s'enroulent 146 pb d'ADN. Quatre types d'histones sont nécessaires à la formation d'un nucléosome. Tout d'abord, les histones H3 et H4 s'associent en dimères puis deux dimères H3-H4 s'associent en un tétramère autour duquel s'enroule l'ADN (146 pb). Deux hétéro-dimères de protéines histones H2A et H2B s'associent ensuite de chaque côté de la structure (H3-H4)*2-ADN. Les nucléosomes se répètent tous les 180 à 200pb formant un nucléofilament qui réduit la longueur de l'ADN d'environ un tiers.

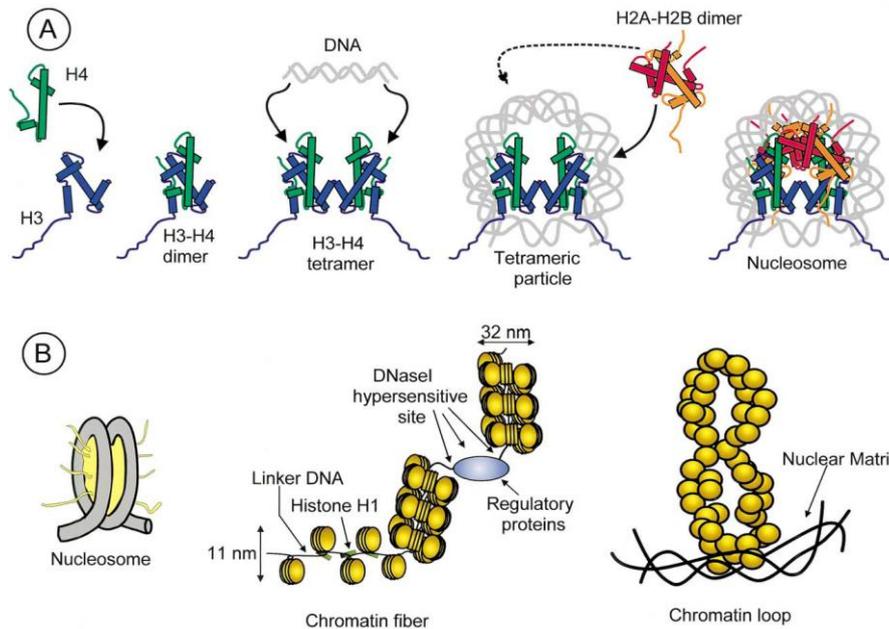


Figure 1 : Compaction du chromosome eucaryote.

(A) Etapes de formation d'un nucléosome. Histone H4 en vert, H3 en bleu, H2A et H2B en rouge et orange.

(B) Repliement du chromosome à partir des nucléosomes représentés en jaune et gris. Formation d'une fibre 11 puis 32 nm. Ensuite cette fibre se replie en boucles d'ADN (Morales et al., 2001).

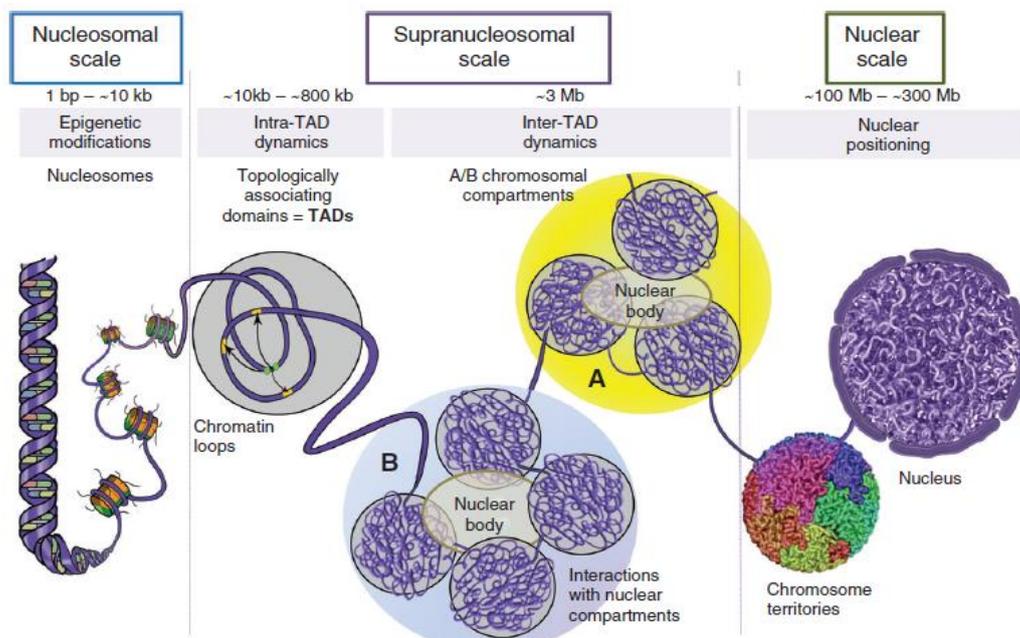


Figure 2 : Organisation des chromosomes eucaryotes

Représentation des différents niveaux d'organisation des chromosomes eucaryotes. Des nucléosomes aux territoires chromosomiques en passant par les TADs et les compartiments A et B (Gollosi et al., 2017).

Des protéines histones H1 s'intercalent entre les nucléosomes, en même temps que les nucléosomes se replient pour former une fibre de 30 nm. Cette fibre s'organise ensuite en boucles de 150 kb à 200 kb d'ADN (Morales et al., 2001) (Figure 1).

- TADs

Des techniques de Captures de Conformations Chromosomiques (3C) ont été développées. Elles reflètent les interactions d'un point du génome avec tous les autres points du génome dans une population de cellules. Le résultat est présenté sous forme d'une matrice de contacts « contact maps ». Ces techniques ont permis la mise en évidence d'un autre niveau d'organisation des chromosomes. En effet, chez certains eucaryotes, le génome se replie en des modules distincts ou domaines physiques aussi appelés TADs (Topological Associated Domains) dont la taille est inférieure à 1Mb (Dixon et al., 2012; Gollosi et al., 2017). Les interactions entre les loci d'un même domaine sont fortes alors qu'elles sont faibles voire inexistantes entre 2 loci de domaines différents. Ces TADs seraient la base moléculaire de l'organisation à grande échelle de ces génomes (Gollosi et al., 2017) (Figure 2 et Figure 5). La formation de ces TADs pourrait être notamment due à la formation de boucles d'ADN par des cohésines qui sont des protéines de type SMC (Structural Maintenance of Chromosome)(Dixon et al., 2012).

-Les protéines de types SMC

Des protéines de la famille des SMC (Structural Maintenance of the Chromosome) sont impliquées dans plusieurs aspects de l'organisation des chromosomes. Elles sont présentes chez les eucaryotes comme chez les procaryotes. Elles ont été identifiées par des études simultanées chez plusieurs espèces, notamment les protéines *smc1* et *smc2* chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* (Strunnikov et al., 1993, 1995), MukBEF chez la bactérie *Escherichia coli* (Niki et al., 1991), ou encore XCAP-C et XCAP-E chez le Xenope (Hirano and Mitchison, 1994).

Ces protéines sont le plus souvent retrouvées sous forme de dimères et associées avec une sous-unité « kleisin » impliquée notamment dans la formation d'une structure en anneau (fermée), et avec une ou plusieurs sous-unités périphériques « kite » ou « hawk » qui ont un rôle encore mal connu. Chez toutes les espèces les protéines de type SMC présentent une structure similaire. Elles contiennent deux domaines globulaires N et C terminaux, connectés par deux longues régions en superhélice ou « coiled-coil » qui contiennent un domaine hinge. Les domaines N et C terminaux, qui possèdent respectivement des motifs WalkerA et WalkerB, se replient pour former un domaine « head » contenant un site de fixation à l'ATP fonctionnel. Deux protéines SMC ainsi formées s'associent en dimères via leur domaine « hinge ». Leurs domaines « head » s'associent également de façon dépendante de l'ATP et via une sous-unité associée de type kleisin (Uhlmann, 2016) (Figure 3).

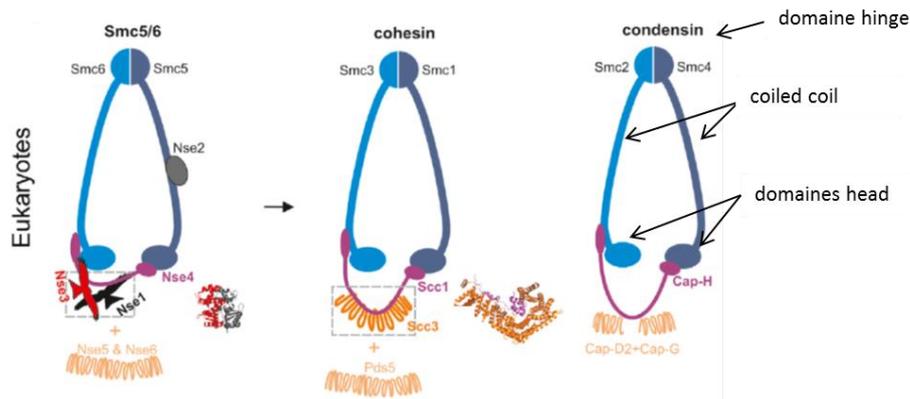


Figure 3 Les protéines de types SMC (Structural Maintenance of Chromosome)

Schéma des 3 complexes de type SMC eucaryotes : SMC6/5, cohésines (SMC3/1) et condensines (SMC2/4).

Les deux monomères de SMC sont représentés respectivement en bleu et gris. Les sous-unités Kleisin en rouge et les sous unités Hawk en orange et Kite en noir et rouge

Le haut des deux monomères forme le domaine « hinge ». Les domaines « head » sont représentés en bas pour chaque monomère et entre les domaines « hinge » et « head » se situe le « coiled coil » (ces domaines sont indiqués par des flèches sur le schéma des condensines) (Palecek and Gruber, 2015).

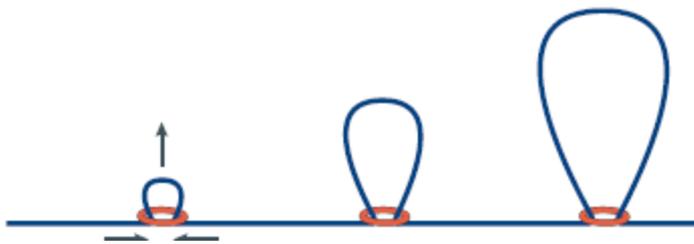


Figure 4: « Loop extrusion »

Schéma représentant les étapes de la « loop extrusion ». L'ADN est progressivement poussé à l'intérieur de l'anneau, ce qui forme une boucle d'ADN à l'intérieur de l'anneau (Uhlmann, 2016).

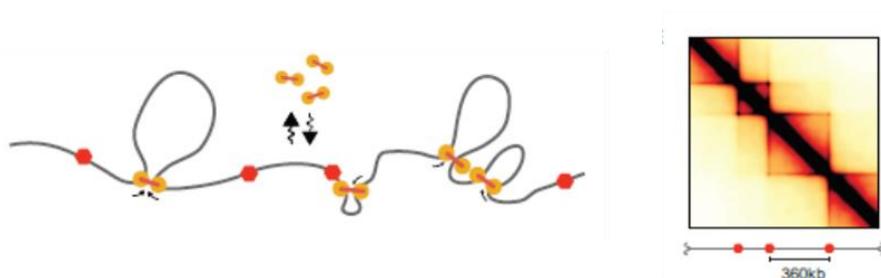


Figure 5: Boucles de chromatine via les cohésines et régulées par CTCF

A droite : Représentation des boucles d'ADN (gris) dues à la cohésine (en jaune) et régulées par CTCF (rouge)

A gauche : Représentation schématique d'une matrice de contacts de Hi-C avec les carrés représentant les TADs (Fudenberg et al., 2016).

Au moins six protéines SMC distinctes sont codées dans les génomes eucaryotes (SMC1-6), sauf chez certains protozoaires parasites n'ayant pas les SMC5 et SMC6 (incluant *Trypanosoma* et *Leishmania*). Ces six protéines forment 3 hétéro-dimères (**Figure 3**) :

- SMC1/SMC3 (sous-unités Scc1 Scc3 et Pds5) qui a une fonction cohésine : en maintenant les deux chromatides sœurs entre elles avant qu'elles soient ségréguées.

-SMC2/SMC4 (sous-unités Cap-D2, Cap-G, Cap-H) qui a un rôle de condensine

-SMC5/SMC6 (sous-unités Nse1-6) impliqué dans la réparation de l'ADN (**Palecek and Gruber, 2015**).

Des études sont toujours en cours concernant le mode d'action de ces différents hétéro-dimères. Un modèle dit de « topological embrace » est privilégié pour la fixation des complexes SMC sur le chromosome. Dans ce modèle, un hétérodimère de SMC et ses sous-unités entourent l'ADN en formant un anneau. Des expériences in vivo ont en effet permis d'observer que condensines, cohésines et SMC5/6 entourent l'ADN de mini-chromosomes (**Cuylen et al., 2011; Haering et al., 2008; Kanno et al., 2015; Murayama and Uhlmann, 2014; Wilhelm et al., 2015**). Cette fixation de l'ADN se ferait via le domaine "hinge". La modification de ce domaine empêche en effet le chargement de SMC sur l'ADN (**Gruber et al., 2006**).

Les complexes SMC5/6-Nse1-6 jouent un rôle dans la réparation de l'ADN en facilitant la résolution d'intermédiaires de recombinaison. Les mécanismes moléculaires impliquant ces protéines restent inconnus. Il a été montré que ce complexe interagit de façon directe avec l'ADN et qu'il fonctionnerait comme un lien intermoléculaire de façon dépendante de l'ATP (**Kanno et al., 2015**).

Plusieurs possibilités ont été proposées pour expliquer la compaction du chromosome via SMC2/SMC4 mais la plus privilégiée est le modèle dit de « loop extrusion ». Dans ce modèle, l'ADN situé des deux côtés de l'anneau de condensine passe progressivement à l'intérieur de l'anneau, formant ainsi une boucle d'ADN (**Figure 4**) (**Nasmyth, 2001**). Le mécanisme par lequel l'ADN serait poussé dans l'anneau n'est pas connu. Des éléments de fixation (ou BE pour Boundary Elements) délimiteraient les boucles (**Fudenberg et al., 2016; Goloborodko et al., 2016; Vietri Rudan et al., 2015; Wit and Laatz, 2012**).

Les cohésines se distinguent des condensines par leur capacité à établir une cohésion entre les deux chromatides sœurs pendant une longue durée (phase S). Cela requiert l'acétylation de 2 lysines du domaine ATPase « head » d'un des dimères de SMC par une acetyltransferase (**Uhlmann, 2016**). Cet acétylation bloque l'anneau cohésine et empêche ainsi le déclenchement de l'hydrolyse de l'ATP et donc la dissociation de la cohésine. Deux possibilités sont envisageables pour expliquer que deux brins d'ADN soient contenus dans le même anneau de cohésine : soit la fourche de réplication passe à travers l'anneau, soit la cohésine établit la cohésion entre les deux chromatides sœurs en coinçant simultanément et stochastiquement les produits de réplication derrière la fourche de réplication (**Uhlmann, 2016**).

Pendant le reste du cycle cellulaire, ces cohésines feraient aussi partie des facteurs responsables de « loop extrusion » (ou LEF pour Loop Extrusion Factors), et formeraient des boucles d'ADN délimitées par CTCF (pour CCCTC binding factor). Il a récemment été montré que les boucles de chromatine liées à CTCF impliquent une paire de sites de fixation CTCF convergents (ces sites sont en effet polarisés)(de Wit et al., 2015). CTCF limiterait aussi la « loop extrusion ». L'ADN passerait dans l'anneau de cohésine jusqu'au site CTCF suivant.(de Wit et al., 2015; Fudenberg et al., 2016; Goloborodko et al., 2016; Vietri Rudan et al., 2015) (Figure 5).

- compartiments A et B

Un autre niveau d'organisation du chromosome a été observé par des études de 3C. L'analyse des matrices de contacts a en effet montré qu'à l'échelle du méga-base, le génome peut être divisé en deux types de blocs (carrés sur la matrice) qui sont soit enrichis, soit appauvris en interactions. Ces blocs, constitués d'un ensemble de TADs, définissent deux types de compartiments A et B. Il y a des interactions fortes entre les loci d'un même compartiment alors qu'elles sont faibles entre loci de compartiments différents(Lieberman-Aiden et al., 2009). Des régions appartenant aux mêmes types de compartiments sont spatialement plus proches dans la cellule. Ces deux types de compartiments correspondent à des états différents de la chromatine. Les compartiments de type B montrent une fréquence d'interaction plus forte pour une distance génomique donnée, que les loci des compartiments de type A, suggérant qu'ils sont plus compactés et contiendraient la chromatine dite « fermée ». Les compartiments de type A contiendraient eux la chromatine dite « ouverte », c'est-à-dire accessible et activement transcrite (Fortin and Hansen, 2015; Lieberman-Aiden et al., 2009) (Figure 2).

A un niveau supérieur, les chromosomes sont organisés dans le noyau en territoires chromosomiques d'une taille allant de 100 à 300 Mb (Figure 2).

Toute cette organisation doit être maintenue pendant toute la durée du cycle cellulaire. Chez les eucaryotes le cycle cellulaire est divisé en 4 phases : G1, S, G2, M. L'ensemble des phases G1, S, G2 constitue l'interphase. La phase M est la phase de mitose ou division cellulaire. La phase G1 est la phase de croissance pré-répllicative, la phase S est la phase de réplication et la phase G2 est une nouvelle phase de croissance qui a lieu une fois la réplication terminée et avant la phase M. La conformation de l'ADN doit donc être adaptée selon ces différentes phases. L'ADN doit notamment être décompacté pendant la réplication, au moins localement de façon transitoire. Il est aussi observé que les chromosomes se compactent durant la phase M. La compaction des chromosomes est en effet importante pour qu'ils soient assez rigides pendant la métaphase (sous-phase de la mitose) où ils s'alignent en formant la plaque équatoriale, et également pour maintenir l'intégrité de ces chromosomes pendant l'anaphase, autre sous-phase de la mitose, pendant laquelle les chromatides sœurs sont séparées.

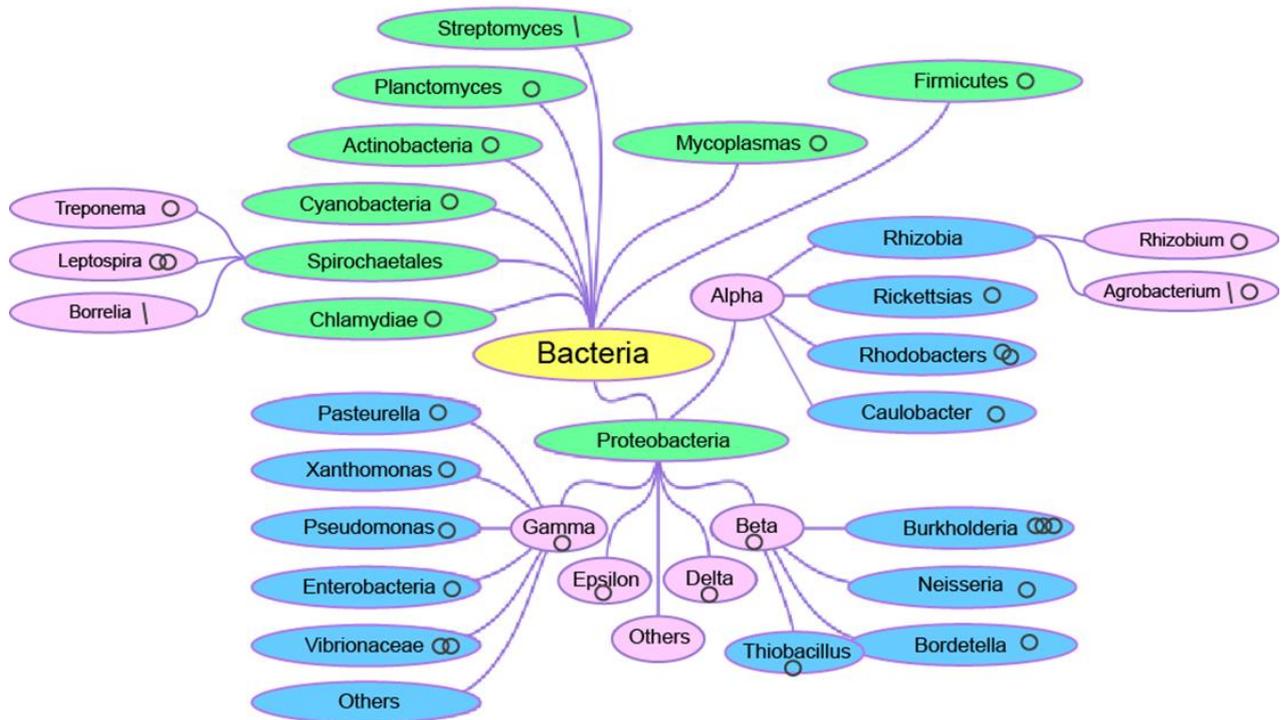


Figure 6: phylogénie des chromosomes bactériens

Phylogénie représentant la forme du génome selon les bactéries. Les ronds indiquent des chromosomes circulaires (si une espèce a plusieurs chromosomes, plusieurs ronds sont représentés). Les traits représentent les chromosomes linéaires.

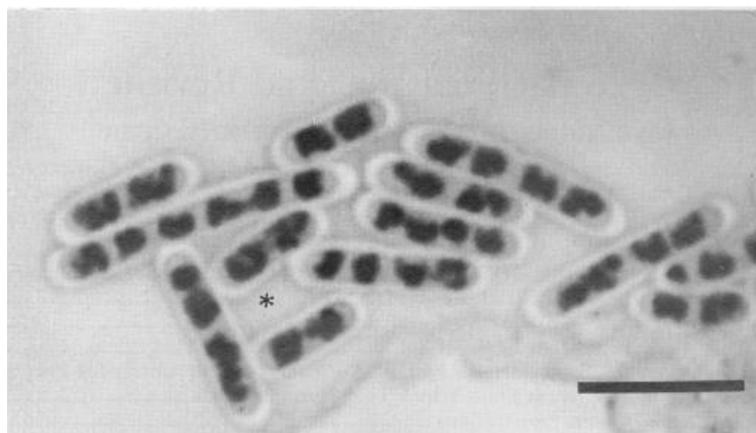


Figure 7 Le nucléoïde coloré au Giemsa

Nucléoïdes d'une culture de *Bacillus*, colorée au Giemsa. Barre 5µm (Robinow and Kellenberger, 1994)

Les chromosomes bactériens présentent également plusieurs niveaux d'organisation, certains ayant des similitudes avec les niveaux eucaryotes, d'autres étant différents. Chez ces organismes, réplication et ségrégation du chromosome sont concomitantes. Il y a donc un enjeu de plus pour le maintien de l'organisation du chromosome au cours du cycle cellulaire.

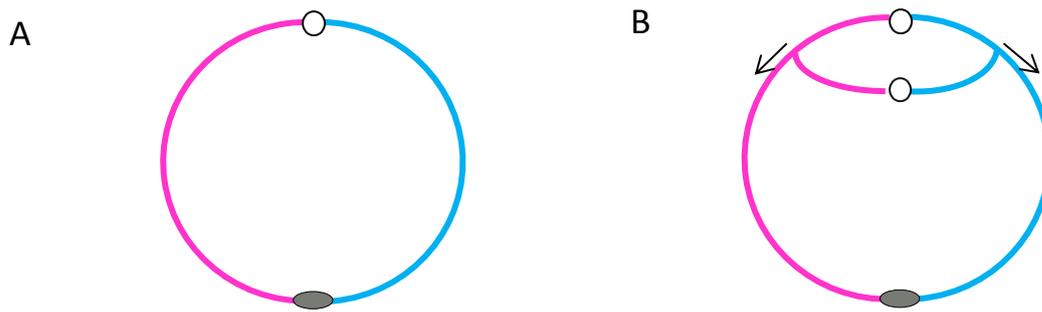
1.2 Les chromosomes bactériens : plusieurs niveaux d'organisation du chromosome.

Les bactéries sont des organismes ubiquitaires microscopiques dont la taille des génomes va de moins de 200 kb à plus de 13 Mb (Rocha, 2008). Elles peuvent avoir différentes formes (bacilles, coques, etc..) et sont capables d'échanges génétiques horizontaux par différents mécanismes (conjugaison, transduction, transformation, transposition) via différents éléments génétiques mobiles (phages, plasmides, transposons).

Deux formes d'ADN sont retrouvées chez les bactéries : l'ADN chromosomique et l'ADN porté par les plasmides ou pièces d'ADN circulaires non chromosomiques. Ces derniers ne sont pas essentiels pour la cellule hôte mais peuvent conférer certains avantages dans certaines conditions de croissance.

Le plus souvent, les bactéries possèdent un unique chromosome circulaire. 10 % des bactéries dont le génome a été séquencé possèdent cependant deux ou plusieurs chromosomes. Ces bactéries appartiennent à différents taxons notamment les Chloroflexi, les Deinococcus, les Spirochaete, les Proteobacteria (de classe alpha, beta, gamma), suggérant que les chromosomes supplémentaires sont apparus de façon indépendante et plusieurs fois au cours de l'évolution (Casjens, 1998). En général ces chromosomes supplémentaires sont circulaires mais dans certains cas ils peuvent être linéaires comme par exemple chez *Agrobacterium* dont l'un des deux chromosomes est linéaire. Par ailleurs, les chromosomes des bactéries des genres *Borelias* et *Streptomyces* sont linéaires (Casjens, 1998; Feijoo-Siota et al., 2017; Val et al., 2014) (Figure 6).

Les chromosomes bactériens sont beaucoup plus petits que les chromosomes eucaryotes (le plus petit chromosome humain est 10 fois plus grand que le chromosome d'*E. coli* qui a une taille de 4 Mb environ). L'absence de noyau dans ces cellules a laissé imaginer un ADN libre dans le cytoplasme. Le développement de nouvelles techniques de microscopie a permis la mise en évidence d'une organisation de l'information génétique. L'utilisation de colorant de l'ADN a en effet permis d'observer en microscopie que cet ADN est confiné dans la cellule dans une région distincte de la cellule ne contenant pas de ribosomes appelée « nucléoïde ». Le « nucléoïde » d'*E. coli* a été décrit pour la première fois en 1937 par Piekarski qui a utilisé un marquage au réactif de Feulgen puis avec une coloration au Giemsa, qui permettent tous deux de visualiser l'ADN (Figure 7). Sa visualisation a ensuite été améliorée avec la microscopie en contraste de phase (Mason and Powelson, 1956, Stempen 1950). Par ailleurs des organisations en « nucléoïdes » ont également été observées pour plusieurs autres types de bactéries notamment par Neumann (Robinow and Kellenberger, 1994). Ensuite en 1963, Cairns a démontré que le chromosome bactérien est unique et circulaire par des observations en autoradiographie du chromosome (Cairns, 1963).

**Figure 8 Le chromosome bactérien circulaire**

(A) Le rond blanc représente l'origine de réplication, l'ovale noir représente le site *dif*.

Le réplichone gauche est représenté en rose, le réplichone droit en bleu

(B) Sur ce schéma est représenté le chromosome circulaire en cours de réplication. Ainsi, on peut voir deux copies de l'origine de réplication. Les deux flèches indiquent le sens des deux fourches de réplication.

L'organisation des chromosomes bactériens a par la suite été étudiée plus en détail et plusieurs niveaux d'organisation ont été ainsi identifiés. Deux types d'organisation du chromosome bactérien peuvent être distingués. Il y a en effet une organisation moléculaire qui est le résultat d'une combinaison de processus. L'ADN est surenroulé et des protéines interagissant avec l'ADN comme les NAPs (Nucleoid Associated Proteins) et les protéines de types SMC (homologues aux protéines SMC eucaryotes) participent aussi à l'organisation et la compaction du chromosome bactérien. A une échelle supérieure des domaines d'interaction ou CIDs (Chromosomal Interaction Domains) ont aussi été identifiés et chez certaines bactéries il existe également une organisation à plus grande échelle en macrodomaines.

Il y aussi une organisation spatiale du chromosome dans la cellule. Selon les bactéries, le chromosome peut ainsi être orienté transversalement ou longitudinalement. Une combinaison de ces deux types d'orientations est aussi retrouvée chez certaines espèces.

1.2.1 Organisation moléculaire

Comme déjà évoqué précédemment, chez les bactéries réplication et ségrégation sont concomitantes. Selon les bactéries, un ou plusieurs nouveau(x) cycle(s) de réplication sont entamés avant la division cellulaire et la fin du cycle de réplication précédent, permettant ainsi à la bactérie d'avoir un cycle cellulaire plus rapide (20 minutes chez *E. coli* par exemple).

En général le chromosome bactérien contient une origine de réplication (*oriC*), un bras droit, un bras gauche, et une région de terminaison. Il est répliqué via deux fourches de réplication qui contiennent les complexes protéiques nécessaires, chacune sur un bras du chromosome (**Figure 8**). La réplication est asymétrique. Elle est en effet continue sur l'un des deux brins d'ADN ou « leading strand » et est discontinue sur le deuxième brin ou « lagging strand » (Rocha, 2004) (**Figure 8**).

L'asymétrie de la réplication entraîne des biais mutationnels :

- Réplication et transcription se font souvent simultanément. La vitesse de l'ARN polymérase (RNAP) est de 50nt/seconde chez *E. coli* soit 20 fois moins rapide que l'ADN polymérase. Des collisions entre ARN polymérase et ADN polymérase sont donc inévitables. La transcription se fait dans le sens 5'→3'; donc ces collisions sont frontales pour le brin « lagging » et co-orientées pour le brin « leading ». Des études ont par ailleurs montré que seules les collisions frontales sont plus dommageables pour la fourche de réplication (Deshpande and Newlon, 1996; French, 1992). Cette différence engendre un biais d'orientation au niveau des gènes sur chaque brin : Il a en effet été observé chez la plupart des bactéries qu'il y a plus de gènes (55 à 80% selon les espèces) sur le brin « leading » (McLean et al., 1998). Chez *Bacillus subtilis* par exemple, 75% des gènes sont sur le brin « leading » (Kunst et al., 1997). Ce pourcentage est de 55% chez *E. coli* (Blattner et al., 1997). De plus, les gènes fortement exprimés sont souvent sur le brin « leading » (Rocha, 2004).

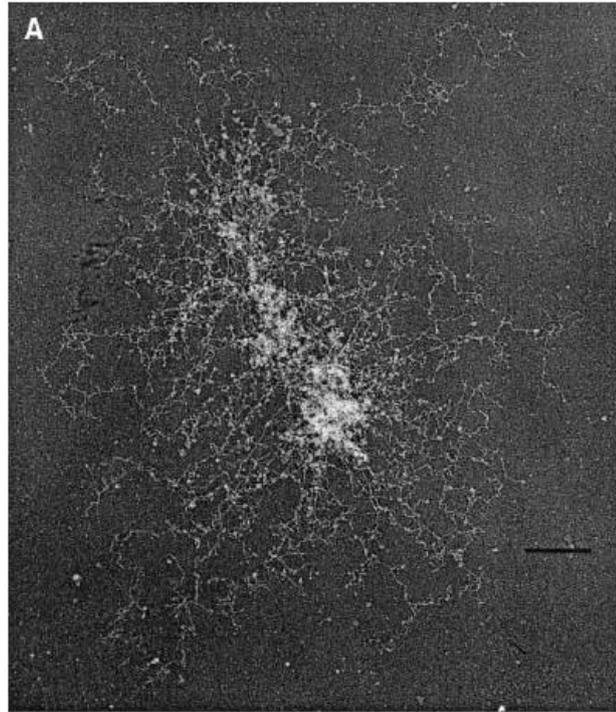


Figure 9: Supercoiling

Photo représentative d'un chromosome prise à 12000X, la barre d'échelle représente 500nm (Postow et al., 2004).

- Un autre biais de composition de gènes est également observé sur les chromosomes bactériens, notamment chez *E. coli*. Sachant que la vitesse de réplication varie autour de 600-1000nt/sec chez cette espèce, cela veut dire qu'il faut entre 40 et 67 min pour répliquer tout le chromosome. En condition de croissance rapide le temps de multiplication observé est de 20 min, ce qui implique que deux à trois cycles de réplication se font en même temps (1 nouveau cycle est initié toutes les 20 minutes). Cela implique aussi qu'il y a dans la cellule plus de copies des gènes situés au niveau de l'origine de réplication qu'au niveau du terminus (de 4 à 8x plus) (Chandler and Pritchard, 1975). Pour cette raison, chez les bactéries à cycle rapide, les gènes essentiels (hautement transcrits ou non) sont souvent regroupés dans la région d'*oriC*.

1.2.1.1. Le surenroulement de l'ADN

Un premier niveau d'organisation du chromosome est le surenroulement négatif de l'ADN qui entraîne la formation de domaines topologiquement isolés sur le chromosome. Une étude réalisée en 1972 chez *E. coli*, a tout d'abord permis la mise en évidence de ces domaines topologiques (Worcel and Burgi, 1972). En effet, il a été observé *in vitro* que si une coupure suffit au relâchement de l'ADN d'un plasmide, un grand nombre de coupures par la DNase I est nécessaire pour relâcher intégralement le chromosome. Dans la même étude, l'utilisation de centrifugations en gradient de sucrose, a permis de montrer que le chromosome est divisé en 12 à 80 domaines. Cela a été confirmé *in vivo* en utilisant du psoralène (un agent pontant) qui fixe les boucles d'ADN (l'incorporation du psoralène est proportionnel au surenroulement négatif) (Sinden and Pettijohn, 1981). 50 domaines par chromosome ont ainsi été délimités. Des analyses ont aussi été réalisées en microscopie électronique et ont permis l'observation de nombreuses boucles émanant d'une région centrale, formant des microdomaines (Kavenoff and Bowen, 1976; Kavenoff and Ryder, 1976). 65 à 200 boucles ou domaines ont été comptés, ce qui corrèle avec les études précédentes. Cependant les techniques utilisées dans ces études ont leurs limites. Notamment les expériences *in vitro* qui peuvent entraîner la formation de barrières lors des étapes d'isolation/fixation de l'ADN et à l'inverse la perte des domaines dus à des interactions transitoires *in vivo*. Concernant les calculs réalisés à partir des images de microscopie, ils ont été faits en partant du principe que tous les domaines sont de même taille ce qui n'est pas prouvé. Plus récemment, chez *Salmonella enterica* l'utilisation d'un outil génétique (la résolvasse $\gamma\delta$ qui requiert le surenroulement négatif de l'ADN pour fonctionner) a réduit la taille des domaines à 25kb (Higgins et al., 1996). En 2004, des études de la réponse transcriptionnelle suite à des cassures doubles brins par des enzymes de restrictions, et des études de microscopie électronique ont finalement permis de conclure que les domaines topologiques sont en moyenne d'une longueur de 10kb (le chromosome de *E. coli* environ 4Mb donc $4000/10 = 400$ domaines) (Postow et al., 2004) (Figure 9). Ils ne sont pas forcément à la même localisation dans chaque cellule et leur taille n'est pas forcément identique.

Ces domaines condensent le chromosome, et aident notamment pour la réparation des cassures double brins d'ADN (en maintenant les deux extrémités cassées entre elles).

Ce surenroulement négatif est régulé par des ADN-topoisomérases. Ces enzymes sont de deux types : les topoisomérases de type I coupent un seul brin d'ADN pour réguler la super-hélicité de l'ADN. Les topoisomérases de type II, comme la gyrase et la topoIV, agissent sur l'ADN par des cassures double brin.

1.2.1.2 Protéines interagissant avec l'ADN

- **NAP (Nucleoid Associated Proteins)**

Une part de la compaction est assurée par des petites protéines abondantes interagissant avec l'ADN, appelées NAP pour Nucleoid Associated Protein. Ces protéines, conservées plus ou moins fortement entre les espèces bactériennes se fixent de façon spécifique et non spécifique sur l'ADN et facilitent la compaction notamment en formant des ponts entre des loci du chromosome ou en courbant l'ADN (Dame, 2005; Dillon and Dorman, 2010). Elles peuvent aussi avoir un impact sur la transcription des gènes et jouer un rôle dans certains processus importants pour la cellule, comme la recombinaison site-spécifique ou la réplication. De nombreuses études les concernant ont été réalisées, surtout chez *E. coli* où environ une dizaine de NAPs ont été identifiées dont les 4 plus connues sont détaillées ci-après (Figure 10). Certaines de ces NAPs sont retrouvées chez *P. aeruginosa*, notamment des homologues fonctionnels de HN-S (*MvaU* et *MvaT*), de HU β , de FIS et de IHF mais leurs rôles dans l'organisation des chromosomes restent à explorer (Kim et al., 2004; Ohniwa et al., 2011; Takeyasu et al., 2004). Si leur structure est maintenant assez bien connue, leur rôle *in vivo* n'est pas facile à caractériser car leur mutation a des effets pléiotropiques et il y a souvent des redondances fonctionnelles.

- **H-NS : Histone-like Structuring Protein** : Cette protéine est conservée chez les Gamma-proteobactérie dont notamment *E. coli*, *P. aeruginosa* (deux homologues fonctionnels *MvaU* et *MvaT*), *Vibrio. Cholerae* (Dillon and Dorman, 2010). Abondante et versatile, elle est constituée d'une partie N-terminale lui permettant de former des dimères et peut se fixer à l'ADN par sa partie C-terminale. Les complexes H-NS-ADN forment des ponts entre des régions d'ADN doubles brins proches et condensent ainsi l'ADN surenroulé. Elle se fixe sur l'ADN, souvent dans des régions riches en AT, au niveau des promoteurs de gènes sensibles au surenroulement de l'ADN renforçant le lien de cette protéine avec celui-ci (Noom et al., 2007). Un site de fixation spécifique de 10pb a plus récemment été identifié au niveau des régions régulatrices des gènes régulés par H-NS. L'alternance entre ces sites de fixation spécifiques de hautes affinités et de fixation dans des régions riches en AT favorise la formation d'oligomères de H-NS, qui peuvent se répartir sur le chromosome entraînant la fixation et donc la régulation d'autres gènes. Elle régule ainsi environ 8% des gènes chez *E.coli* principalement en les réprimant (notamment les gènes issus du transfert horizontal).

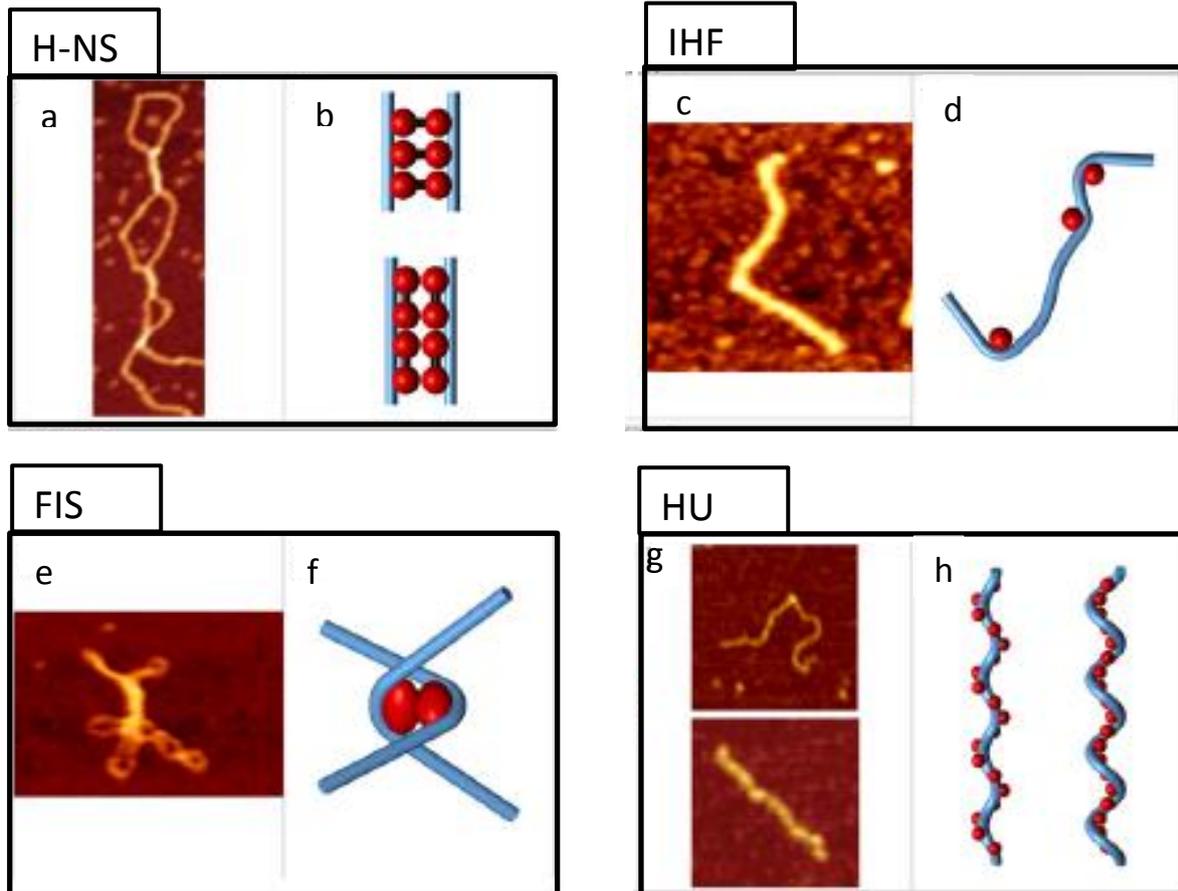


Figure 10 : 4 exemple de NAPs (Nucléoid Associated Proteins)

a, image en SFM (Scanning Force Microscopy) de boucles d'ADN, conséquences du « bridging » d'un duplex d'ADN par H-NS

b modèle basse résolution du « bridging » d'un duplex d'ADN par H-NS

c image en SFM d'un complexe ADN-IHF

g image en SFM d'un complexe ADN-HU qui courbe l'ADN à basse concentration (photo du haut) et forme des filaments rigides à forte concentration (photo du bas)

d,h modèle basse résolution de la compaction de l'ADN par fixation de nombreuses molécules de IHF/HU et par formation de filaments de HU

e image en SFM des complexes ADN-FIS qui entraînent la formation de nœuds

f modèle basse résolution des nœuds formés par FIS sur l'ADN via des interactions FIS-FIS

(Luijsterburg and Noom, 2006).

- **HU : Heat-Unstable Protein** : Cette protéine est retrouvée chez la plupart des bactéries. HU peut exister sous forme d'homodimères ou d'hétérodimères (selon la croissance de la bactérie) formés des sous-unités HU α et HU β qui sont identiques en séquence à 70%. HU se fixe de manière non spécifique sur l'ADN mais avec une préférence pour les régions déformées et/ou riches en AT (comme les régions courbées). En fonction de sa concentration, cette protéine peut avoir différents effets. La fixation de simples dimères à différentes positions, peut courber localement l'ADN et augmenter sa flexibilité (Swinger and Rice, 2004). A plus forte concentration, HU peut également former des filaments rigides dans lesquels HU et l'ADN sont enroulés en spirales (Luijsterburg et al., 2006) et participer ainsi à l'organisation du chromosome. HU est présent en très grand nombre sur le chromosome en phase exponentielle, et en le recouvrant permet de courber 10% de l'ADN (environ 30000 HU par cellule) (Ali Azam et al., 1999). HU aurait un effet sur le surenroulement négatif car sa mutation entraîne une diminution du surenroulement de l'ADN. Chez *Caulobacter crescentus*, l'effet de HU sur le chromosome a été étudié par capture de conformation chromosomique (HI-C) ce qui a confirmé un effet global sur la compaction du chromosome.

- **IHF (Integration Host Factor)** : Egalement présente chez la plupart des bactéries, c'est une protéine homologue à HU en séquence mais elle a un mode d'interaction avec l'ADN différent. Sa forme native est un hétéro-dimère. Cette protéine se fixe sur l'ADN entraînant sa courbure d'environ 160°. Elle peut donc fortement influencer la structure de l'ADN et entraîne la formation de boucles d'ADN réduisant la longueur de ce dernier jusqu'à 30% (Luijsterburg et al., 2006). Chez *E.coli* elle se fixe sur des sites spécifiques (1000 sites sur le chromosome) souvent localisés proches des promoteurs des gènes. Elle est en effet reconnue comme un facteur de régulation de la transcription de nombreux gènes (Swinger and Rice, 2004). Elle est particulièrement abondante en début de phase stationnaire suggérant un rôle de cette protéine sur le nucléoïde (structural ou fonctionnel) pendant la transition phase exponentielle/phase stationnaire (Ali Azam et al., 1999).

- **FIS : Factor for Inversion Stimulation** : Cette protéine a d'abord été identifiée chez *E. coli* puis a été retrouvée chez d'autres Gamma-protéobactérie en tant que facteur impliqué dans la recombinaison site-spécifique. Elle est également constituée de deux sous unités. Les homo-dimères de FIS se fixe à l'ADN de façon spécifique sur une séquence de 17bp riche en AT et courbent l'ADN d'environ 50-90°. Ils influencent ainsi probablement l'organisation et la compaction de l'ADN (Dillon and Dorman, 2010). Cette fixation se fait à de nombreuses localisations surtout dans les régions promotrices. FIS peut en effet activer ou réprimer l'expression des gènes notamment de gènes impliqués dans la croissance comme le montre son expression au cours du cycle cellulaire. Il régule l'expression d'une topoisomérase (gyrase) influençant ainsi le surenroulement de l'ADN. C'est la NAP la plus abondante chez *E. coli* en phase exponentielle de croissance. Son expression diminue ensuite jusqu'à devenir indétectable en phase stationnaire (Ali Azam et al., 1999).

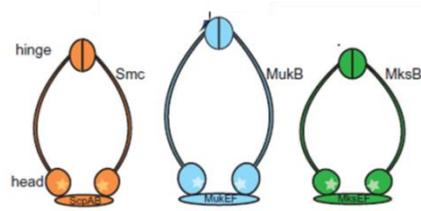


Figure 11: Les condensines bactériennes

Les 3 familles de condensines retrouvées chez les bactéries sont représentées ici.

SMC-ScpA/B en orange à gauche

MukB-MukEF en bleu au centre

MksB-MksEF en vert à droite (Gruber, 2011).

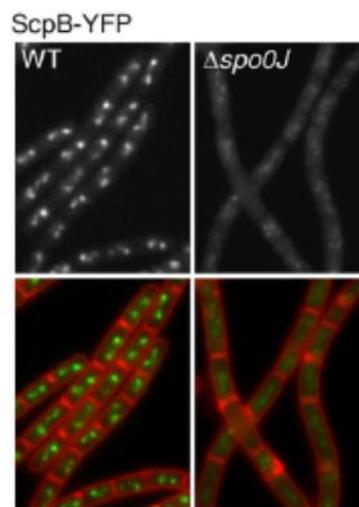


Figure 12 : Localisation de ScpB-YFP dans une souche WT et dans le mutant $\Delta spo0J$

En haut : Localisation de ScpB-YFP, dans une souche sauvage à gauche et $\Delta spo0J$ à droite.

En bas : superposition de la localisation de ScpB-YFP, dans une souche sauvage à gauche et $\Delta spo0J$ à droite, et de la coloration des membranes avec du TMA-DPH (triméthylamine-diphénylhexatriène) (Sullivan et al., 2009).

- Les protéines de type SMC

Chez les bactéries, les complexes protéiques de type SMC ou condensines bactériennes sont beaucoup moins abondants que les NAPs. Ces condensines bactériennes sont retrouvées dans la grande majorité des espèces bactériennes séquencées. Elles contiennent un dimère de protéines de type SMC fortement homologues aux condensines eucaryotes et des sous-unités associées qui sont plus proches de celles associées aux protéines SMC5/6 (Palecek and Gruber, 2015). Au vue des défauts observés en cas d'inactivation de ces condensines bactériennes, ces complexes protéiques jouent un rôle dans l'organisation et la ségrégation des chromosomes.

Trois grandes familles de condensines bactériennes ont été identifiées : SMC et ses sous-unités associées ScpA et ScpB, MukB et ses sous-unités associées MukE et MukF et plus récemment MksB et ses sous-unités associées MksE et MksF (Figure 11). Même si elles diffèrent par leurs séquences, elles présentent toutes une architecture similaire. La plupart des bactéries possèdent un complexe SMC-ScpA/B (Soppa et al., 2002) ; Chez certaines gamma-protéobactéries SMC est remplacé par MukBEF comme *E.coli* et *V. cholerae* (Niki et al., 1991; Rybenkov et al., 2014). Plus récemment le complexe MksbEF a été identifié chez certaines espèces (Petrushenko et al., 2011). Certaines bactéries ont plusieurs condensines bactériennes. C'est notamment le cas de la souche PAO1 de *P. aeruginosa* possède un complexe SMC et un complexe MksBEF (Petrushenko et al., 2011). Il y a aussi des bactéries qui ont plusieurs complexes MksBEF et un complexe SMC/ScpAB (*Pseudomonas synrigae*, *Roseburia inulinivora*, *Bifidobacterium longum*), d'autres qui ont MukBEF et SMC-ScpA/B (*Aeromonas*) et des bactéries qui ont un complexe MksBEF, un complexe MukBEF et un complexe SMC/ScpAB (*Photobacterium luminescens subsp laumondii*) (Petrushenko et al., 2011). Plusieurs combinaisons sont donc possibles et le rôle propre à chaque complexe (selon ces différentes conditions) reste à caractériser plus en détails. Selon les bactéries ces condensines sont plus ou moins essentielles. Ainsi chez *B. subtilis*, la délétion de SMC a un fort impact sur la ségrégation (Britton et al., 1998) et *smc* est même essentiel pour la ségrégation des origines en condition de croissance rapide cf. détails SMC-ScpA/B) alors que chez *P. aeruginosa* sa mutation n'a qu'un faible impact (voir deuxième partie des résultats).

Des détails concernant ces trois familles de condensines sont donnés ci-après :

- Le complexe SMC-ScpA/B le plus étudié est celui de la bactérie *B. subtilis*. Chez cette bactérie un mutant Δ SMC ne peut être isolé en milieu riche mais est viable en conditions de croissance lente (Britton et al., 1998; Gruber et al., 2014; Wang et al., 2014). Chez *C. crescentus*, il avait été initialement observé qu'un mutant Δ SMC n'était pas viable en condition de croissance rapide (sensible à la température) mais une étude plus récente a montré que SMC est viable en condition de laboratoire (Jensen and Shapiro, 1999; Le et al., 2013).

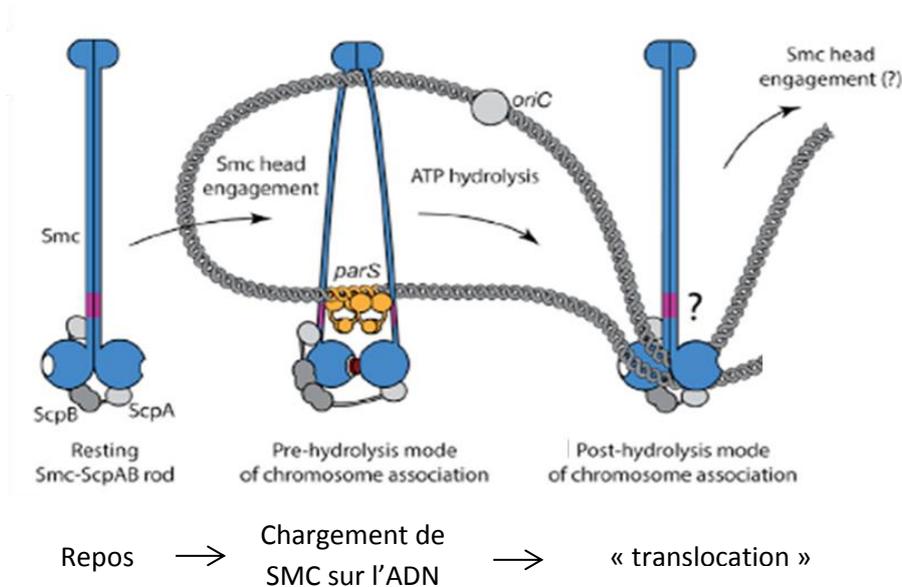


Figure 13 : Modèle de recrutement de SMC-ScpAB sur l'ADN

Modèle de recrutement de SMC –ScpAB (en bleu et gris) sur l'ADN (en gris) puis déplacement de SMC depuis le site de recrutement par « translocation ».

A gauche : Schéma de la conformation « rod » ne permettant pas de se fixer l'ADN via le domaine « hinged » ni au niveau de ParB/*parS* (en jaune) via le « coiled-coil »

Au centre : après dissolution de la conformation « rod » et engagement des domaines « head » SMC-ScpAB peut être recruté au niveau des *parS*. SMC-ScpAB est alors en conformation « ring »

A droite : Après l'hydrolyse de l'ATP, SMC-scpAB reprend une conformation « rod » et se déplace par un processus de « translocation » sur le chromosome.

(Minnen et al., 2016)

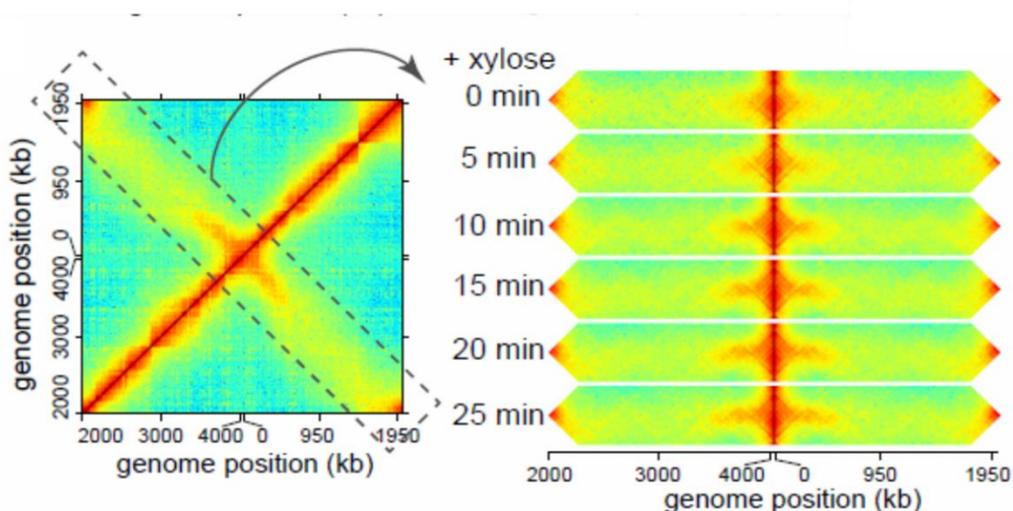


Figure 14: Juxtaposition de l'ADN par SMC chez *C. crescentus*

Cinétique en Hi-C après 5h sans ParB (placé sous un promoteur inducible au Xylose). Au temps zéro, du Xylose est ajouté dans la culture ce qui permet d'exprimer à nouveau ParB. Pour simplifier la représentation, la deuxième diagonale est représentée horizontalement pour chaque point de la cinétique (à droite)(Tran et al., 2017).

Ces résultats indiquent un rôle important de SMC dans la ségrégation du chromosome chez ces bactéries et particulièrement des origines de réplication. Il a été montré chez *B. subtilis*, que le complexe SMC-ScpAB est recruté au niveau d'*oriC* par une protéine du système de partition impliquée dans la ségrégation du chromosome (ParB ou SpoJ cf plus loin). En effet la localisation de SMC en microscopie montre qu'en l'absence de ParB, SMC et ses deux sous-unités ScpA et ScpB ne forment pas de foci discrets mais sont diffus dans le cytoplasme alors qu'en condition WT, un foci intense en fluorescence est observé au niveau d'*oriC* (Sullivan et al., 2009) (Figure 12). Ces résultats indiquent que ParB est nécessaire pour un recrutement efficace de SMC sur le chromosome. Cela a également été confirmé par ChIP-seq. En effet en présence de ParB, SMC se fixe fortement dans la région *oriC* et au niveau de gènes hautement transcrits comme les opérons ribosomiques. Par contre, la fixation dans une région de 1Mb autour d'*oriC* est largement réduite en absence de ParB. La fixation des gènes fortement transcrits est identique en présence ou en absence de ParB (Gruber and Errington, 2009). Une fois chargé sur le chromosome, le complexe se déplace, en juxtaposant l'ADN entourant son site de fixation. SMC-ScpAB serait ainsi impliqué dans l'alignement des deux bras du chromosome dans la cellule via de la « loop extrusion » (Le et al., 2013; Minnen et al., 2016; Wang et al., 2015, 2017). Cet alignement des bras par SMC a aussi été observé chez *C. crescentus* et chez ces deux espèces (*B. subtilis*, *C. crescentus*) la matrice de contacts d'un mutant Δ SMC montre une perte des interactions entre les deux bras du chromosome (cf partie orientation spatiale du chromosome) (Le et al., 2013; Wang et al., 2015) (Figure 14).

Chez *B. subtilis*, plusieurs études se sont intéressées aux mécanismes de chargement de SMC sur l'ADN et à son action sur le chromosome après chargement. Pour cela des analyses biochimiques notamment de cristallographie ont été réalisées. Ces études ont permis de montrer que chez cette bactérie la dimérisation de deux monomères de SMC via leur domaine « hinge » entraîne l'alignement des leurs deux régions « coil-coiled », produisant une molécule de SMC dimérique allongée, en forme de barre ou « rod shaped » (Soh et al., 2015). L'alignement des deux régions coil-coiled est notamment détecté par des fixations covalentes de cystéines (introduites par mutation de résidus, cette mutation n'ayant pas d'effet sur la fonctionnalité de la protéine) (Soh et al., 2015). La sous-unité Kleisin ScpA se fixe sur deux interfaces distinctes de ce dimère de SMC. D'une part le domaine N-terminal de ScpA interagit avec le « coiled-coil » d'un monomère de SMC. D'autre part, la région C-terminale de ScpA s'attache au domaine « head » de l'autre sous-unité (Bürmann et al., 2013). Chez *B. subtilis*, un mutant de substitution qui empêche l'interaction de ScpA avec les domaines « head » a le même phénotype de croissance qu'un mutant Δ smc.

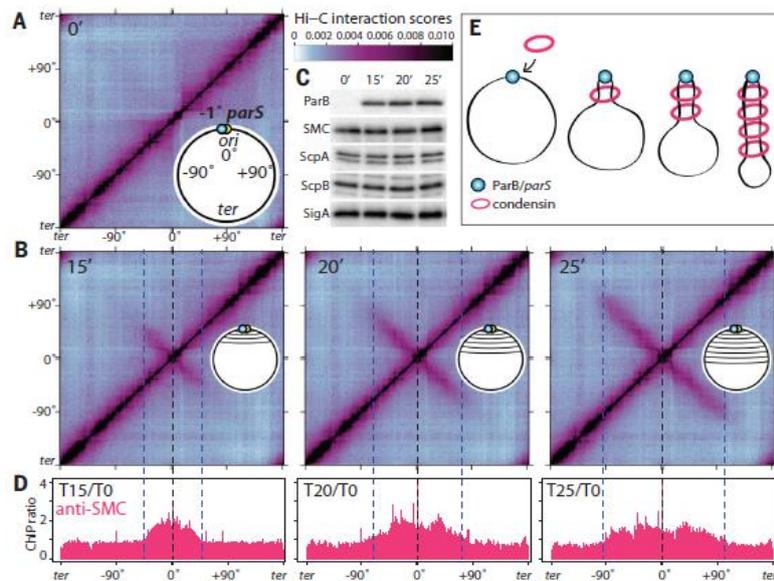


Figure 15: SMC juxtapose l'ADN à partir de son site de chargement sur l'ADN

(A) et (B) Matrice de contact (10kb bin) obtenue après HI-C d'une souche de *B.subtilis* possédant un seul site *parS* à -1 degrés d'*oriC* et une version fusionnée à la GFP de ParB inducible à l'IPTG. Les matrices montrent les interactions entre les loci avant induction à l'IPTG (A) et après induction à différents temps (B). Sur les matrices la position du génome est donnée et est centrée sur l'origine de réplication. La position du *parS* est indiquée en pointillé noir et les limites de l'ADN juxtaposé sont indiquées en pointillé bleu.

(C) Immunoblots des mêmes échantillons qu'en (A) et (B) qui montrent l'accumulation de ParB-GFP au cours du temps ainsi que la quantité de condensines bactériennes SMC-ScpAB et d'un contrôle de chargement SigA.

(D) ChIP-seq de SMC réalisés dans les mêmes conditions qu'en (A) et (B). Le nombre de read des échantillons de ChIP et des Input a été normalisé par le nombre de read total. Le ratio ChIP/Input pour chaque point par rapport au point 0 est représenté (1kb bin).

(E) Interprétation schématique des données de Hi-C et de ChIP-seq qui montre la progression de la fixation de SMC depuis le site *parS*.

(Wang et al., 2017)

Des expériences de « pull-down » (méthode permettant de détecter les interactions protéines-protéines) chez ce même mutant ont montré qu'il n'y a plus d'interactions entre les domaines « head » et le domaine de ScpA muté. Les interactions entre la région N-terminal et le « coiled-coil » de SMC ont été détectées par chromatographie d'exclusion de taille (Bürmann et al., 2013). Il a été observé que lors du chargement de SMC sur l'ADN, le dimère de SMC change de conformation, passant de la forme « rod » à la conformation en anneau ou « ring » et se fixe alors sur l'ADN. L'engagement des domaines « head » favoriserait ce changement (Figure 13). Des expériences de fixation covalentes de cystéines chez un mutant de l'engagement des domaines « head » ont en effet montré que celui-ci reste bloqué en configuration « rod ». Ces études ont également permis d'observer que la fixation de l'ATP au niveau des domaines « head » faciliterait l'ouverture des deux bras de SMC (Soh et al., 2015). Un site de fixation de l'ADN, initialement non-visible sur le domaine « hinge », serait alors apparent. Des études structurales ont montré que ce site est caché dans la configuration initiale, et que s'il est muté, l'interaction entre SMC et l'ADN n'est plus détectée selon des mesures d'anisotropie de fluorescence (Soh et al., 2015). La fixation de l'ADN au niveau de ce site stabiliserait la conformation ouverte de SMC ou « ring » comme le montre l'absence de fixation covalente des cystéines entre les régions « coiled-coil » dans des expériences réalisées en présence d'ADN (Soh et al., 2015). Par ailleurs des études de ChIP-seq de SMC chez des mutants de la fixation de l'ATP ou de l'engagement des domaines « head » ont montré que chez ces mutants, SMC se fixe très faiblement sur le chromosome alors que dans des conditions sauvage SMC se fixe fortement dans la région *d'oriC* (Minnen et al., 2016) SMC se fixe également faiblement sur le chromosome de mutants Δ ScpA et Δ ScpB (Minnen et al., 2016). Ces résultats indiquent que, les sous-unités ScpA et ScpB sont aussi importantes pour le recrutement de SMC-ScpAB sur l'ADN.

L'importance fonctionnelle des « coiled-coil » de SMC a aussi été étudiée. Ces structures ont un rôle passif de barrière pour l'ADN piégé dans l'anneau de SMC, qui est confirmé par le fait qu'une coupure artificielle au niveau de ces structures rend SMC non fonctionnel (Cuylen et al., 2011). Récemment une étude réalisée chez *B. subtilis* a montré que ces structures auraient aussi un rôle actif dans le processus de « piège de l'ADN » dans l'anneau de SMC, dans le passage de la conformation « rod » à la conformation « ring » ou encore pour inhiber le cycle de l'ATPase de SMC afin d'éviter le déchargement de SMC de l'ADN (Bürmann et al., 2017). Les « coiled coil » sont formés d'hélices alpha avec des séquences répétitives. L'étude de nombreux mutants a montré que la périodicité de ces répétitions du « coiled-coil » est importante (Bürmann et al., 2017) Ainsi toutes les longueurs de « coiled-coil » ne permettent pas d'avoir une protéine fonctionnelle. La longueur et la rigidité de ces « coiled coil » seraient importantes pour leur fonctionnement et une mutation impactant l'une ou l'autre entraînerait un phénotype similaire à celui observé pour un mutant ATPase.

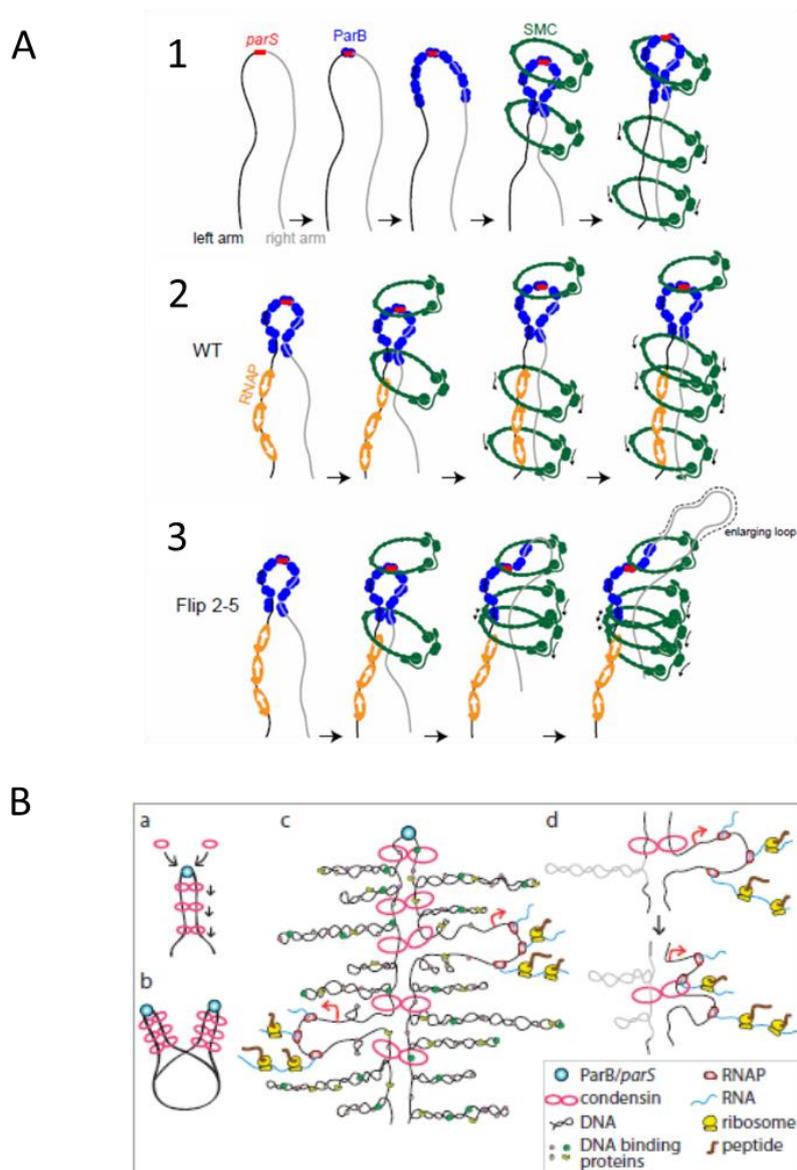


Figure 16: Modèles de fonctionnement de SMC chez *B. subtilis* et *C. crescentus*

A) *C. crescentus* (1) ParB (en bleu) se fixe sur le site *parS* (rouge) et recrute SMC (vert foncé). SMC aligne les bras gauche (noir) et droit (gris) du chromosome. Un complexe SMC-ScpA-ScpB pourrait entourer les deux bras du chromosome ou deux complexes SMC-ScpAB pourraient chacun entourer un bras (« handcuffing »). Seul le cas où un complexe SMC-ScpAB encercle un bras est représenté. (2) et (3) Modèle schématique de la dissociation de SMC du bras gauche du chromosome par une forte densité d'ARN polymérase convergentes.

B) *B. subtilis* (a) les anneaux de condensines (rose) chargé par ParB lié au *parS* (bleu turquoise) se déplacent sur le chromosome (noir) (« handcuffing ») (b) Séparation des deux origines par allongement des boucles. Alternativement un simple anneau de condensine ou plusieurs anneaux pourraient entourer les deux bras du chromosome (de chaque côté de *parS*).

(c) les anneaux de condensines liés rencontrent des barrières topologiques, des protéines se fixant à l'ADN, ARN polymérase, des ribosomes traduisant les transcrits naissants. (d) modèle schématique des rencontres entre anneaux de condensines attachés et une barrière topologique ou complexe de transcription.

(Tran et al., 2017; Wang et al., 2017)

Chez *B. subtilis*, le déplacement de SMC tout le long du chromosome après chargement a été confirmé par des études en ChIP-seq et en HI-C (cinétique) en utilisant une version inductible de ParB. Ces études montrent en effet que la fixation de SMC s'étend au fur et à mesure sur le chromosome à partir du site spécifique de fixation de ParB (Wang et al., 2017) (Figure 15). Un cycle complet d'hydrolyse de l'ATP serait impliqué dans la translocation de SMC-ScpA/B sur l'ADN après recrutement. Un mutant ayant une activité ATPase réduite montre en effet une fixation plus forte au niveau des sites spécifiques de ParB mais un peu moins forte dans les régions alentours (Minnen et al., 2016; Wang et al., 2017). Le déplacement de SMC sur le chromosome corrèle avec l'alignement des deux bras du chromosome observé par des expériences de HI-C réalisées en même temps que la cinétique en ChIP-seq (Figure 15) (Wang et al., 2017).

Deux possibilités ont été proposées pour le mécanisme de déplacement de SMC. Le premier modèle implique que deux anneaux de SMC encerclent chacun un bras du chromosome, c'est le modèle du « handcuffing » (Figure 16). L'autre possibilité est que l'ADN des deux bras passerait par un seul anneau de SMC (Wang et al., 2017). Chez *C. crescentus* le même type d'analyse que chez *B. subtilis* a été effectué. Il a en effet été montré que chez cette bactérie, qui a aussi un chromosome orienté longitudinalement, SMC est chargé sur le chromosome au niveau des sites spécifiques de fixation de ParB puis se déplace sur le chromosome et aligne ainsi les deux bras du chromosome comme c'est cas chez *B. subtilis*. Par contre, à la différence de cette dernière, chez *C. crescentus*, SMC n'est pas détecté jusqu'au terminus de réplication. Cette observation pourrait par exemple s'expliquer par une différence entre les ATPases des deux bactéries qui entraînerait une différence de taux d'ouverture/fermeture de l'anneau et aurait pour résultat une différence de longueur d'alignement. (Schwartz and Shapiro, 2011; Tran et al., 2017) (Figure 16 et Figure 17). Des études sont toutefois encore nécessaires afin de confirmer les modèles pour chaque bactérie.

En déplaçant les sites de fixation de ParB sur le chromosome, il a été observé que l'alignement des bras du chromosome à partir de ce site via SMC, n'est pas toujours symétrique mais dépend aussi de l'environnement génétique. La présence de gènes fortement transcrits pourrait notamment gêner l'alignement des bras du chromosome par SMC. (Wang et al., 2015, 2017). Ainsi chez *B. subtilis* lorsqu'un site de fixation de ParB est déplacé à côté d'un opéron ribosomique (gènes fortement transcrits), les matrices de HI-C montrent un alignement asymétrique des bras du chromosome (Figure 17) (Wang et al., 2017). Ce résultat suggère que les condensines bactériennes sont bloquées par ces gènes hautement transcrits. Des résultats similaires ont été obtenus chez *C. crescentus* (Tran et al., 2017).

En synthèse, chez *B. subtilis* et *C. crescentus*, SMC initialement en configuration dites « rod » serait recruté sur l'ADN via ParB/*parS*.

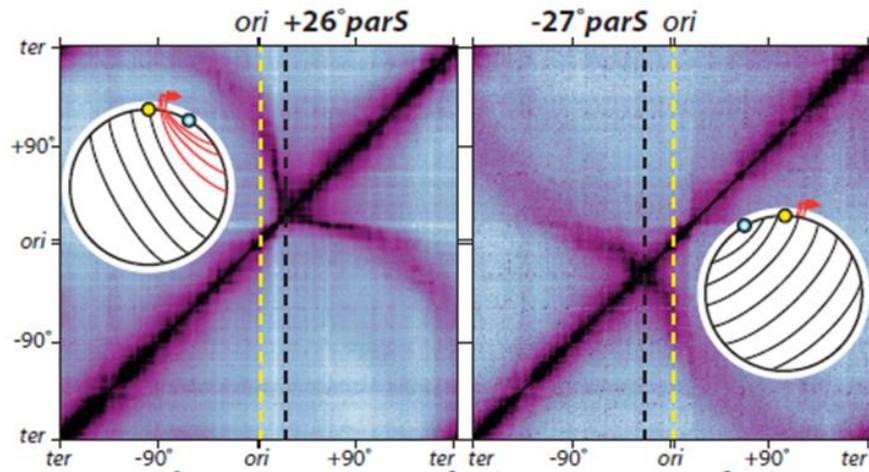


Figure 17: Matrices de contacts de souches ayant un site *parS* déplacé chez *B. subtilis*

A gauche : Matrice de contacts d'une souche de *B. subtilis* ayant un site *parS* à +26 kb

A droite : Matrice de contacts d'une souche de *B. subtilis* ayant un site *parS* à -27kb

Les matrices sont centrées sur l'origine de réplication. Les pointillés jaunes indiquent la position de l'origine et les pointillés noirs la position de *parS*.

Sur chaque matrice, un schéma représente la juxtaposition de l'ADN et les lignes rouges montrent l'asymétrie de juxtaposition de l'ADN au niveau des gènes fortement transcrits (indiqués par les flèches rouges).

(Wang et al., 2017)

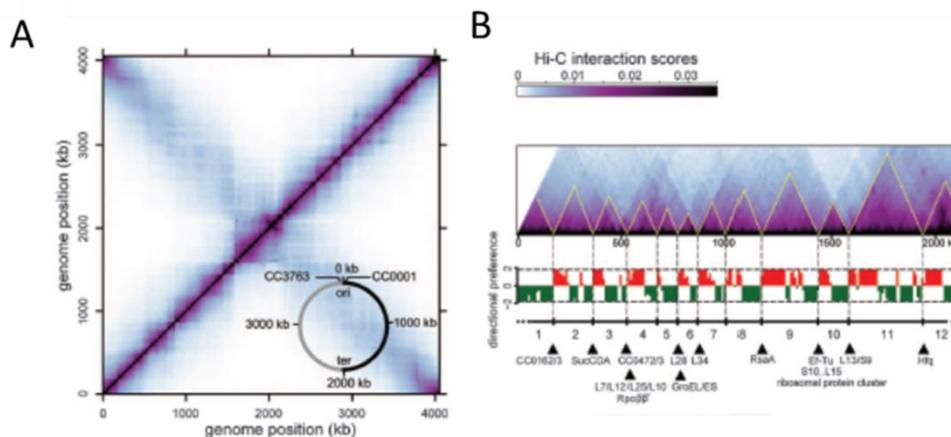


Figure 18: Visualisation des CIDs par Hi-C chez *C. crescentus*

A) matrice de contact (Hi-C) de la souche sauvage de *C. crescentus*

B) zoom sur la diagonale principale de la matrice permettant de visualiser les triangles ou CIDs

(Le et al., 2013)

Ce recrutement requiert la fixation de l'ATP et l'engagement des domaines « head » de SMC ce qui favorise l'ouverture des deux structures en « coil-coiled » et donc le changement de configuration de SMC de « rod » à « ring ». SMC est ensuite relocalisé sur l'ADN et aligne les bras du chromosome à partir de *parS*. Cette relocalisation requiert notamment l'hydrolyse de l'ATP et SMC reprends alors une configuration « rod ». L'alignement peut se faire via un complexe SMC sur chaque bras du chromosome, ou via un seul complexe SMC entourant les deux bras du chromosome.

- MukBEF, qui fait partie des gènes qui ont co-évolué avec la Dam-méthyltransférase ou DamMT (Brezellec et al., 2006) est retrouvée chez la plupart des entérobactéries et plusieurs autres ordres des gamma-proteobactéries (Hiraga, 2000). MukB, protéine de 177 kDa, a été identifié chez *E. coli* suite à un crible visant à trouver des mutants induisant la production d'un fort pourcentage de cellules sans nucléoides (Nasmyth and Haering, 2005). L'inactivation de MukBEF entraîne en effet une désorganisation et une décondensation du chromosome et la formation de 20% de cellules anucléées (défaut de ségrégation) (Niki et al., 1991; Rybenkov et al., 2014), indiquant un rôle de ce complexe dans ces différents phénomènes. Récemment une étude réalisée au laboratoire chez *E. coli* en 3C-seq a montré qu'il y a une modification des interactions sur tout le chromosome sauf au niveau du macrodomaine Ter (Lioy et al en review). En effet en l'absence de MukB, les interactions à longue distance diminuent et les interactions à moyenne distance augmentent sur la matrice de contacts. Donc MukB favoriserait les interactions longues distances (Lioy et al en review). Des études en microscopie montrent qu'en l'absence de MukB les bras droit et gauche du chromosome sont mal-positionnés (Danilova et al., 2007). Ces résultats indiquent que MukB pourrait avoir un rôle dans l'organisation transversale du chromosome. Par ailleurs il a été montré dans une autre étude chez *E. coli*, qu'il y a un lien entre l'action de topoIV et le rôle de MukBEF pour faciliter la ségrégation des chromosomes L'une des sous-unités de la TopoIV interagirait en effet avec MukB. (Hayama and Mariani, 2010). Des études de microscopie en time-lapse ont montré que lorsque cette interaction est altérée, 12 min de plus sont nécessaires pour ségréger 50% des cellules que lorsque les interactions sont normales. Il y a également une diminution du nombre de cellules ayant deux copies de l'origine lorsque l'interaction TopoIV-MukB est altérée, selon des observations en snapshots (Zawadzki et al., 2015).
- MksBEF ou Muk-like SMC : cette troisième famille de condensines a été identifiée beaucoup plus récemment (Petrushenko et al., 2011). Même si l'homologie de séquence entre MukBEF et MksBEF n'est qu'à peine détectable, une organisation en opéron similaire a été observée et la structure secondaire de MksBEF semble être similaire à MukBEF. Une particularité de MksB est sa région « coiled-coil » plus courte que celle de MukB ou d'autres condensines bactériennes (Petrushenko et al., 2011).

1. Organisation des chromosomes

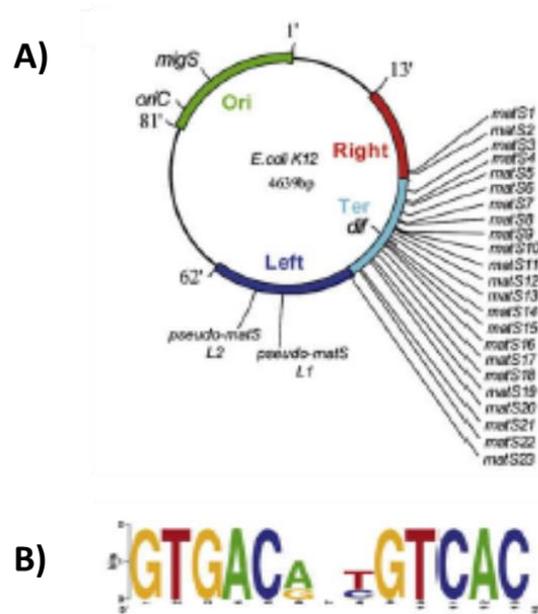


Figure 19: Organisation du chromosome d'*E. coli* en macrodomaines

A) Le macrodomaine ori (en vert) contenant l'origine de réplication est entouré par les deux domaines non structurés : NS Right et NS Left (traits noirs). A l'opposé le macrodomaine Ter (en bleu clair) contenant la séquence de terminaison *dif* est encadré par les macrodomaines Right (en rouge) et Left (en bleu foncé). Les 23 sites *matS* sont indiqués sur le schéma.

B) Motif de la séquence des sites *matS*.

(Mercier et al., 2008)

MksBEF est retrouvée dans un grand nombre de protéobactéries et sa distribution au sein des espèces laisse penser à une transmission par transfert horizontal (d'autres études de l'évolution des condensines sont encore nécessaires). Souvent retrouvée chez les *Pseudomonas* et notamment chez *P. aeruginosa* MksB pourrait agir comme une condensine et pourrait être impliquée dans l'organisation et la ségrégation du chromosome

1.2.1.3 Chromosomal Interaction Domains (CID)

De récentes études de HI-C (capture de conformation chromosomique) ont montré que le chromosome de *C. crescentus* est divisé en 23 Chromosomal Interaction Domains (CIDs) d'environ 166kb (Le et al., 2013) (Figure 18). Ces CIDs ont également été retrouvés chez d'autres bactéries comme *B. subtilis* (20 domaines identifiés) (Wang et al 2015, Marbouty 2015), *V. cholerae* (Val et al), *P. aeruginosa* et *E. coli* (données non publiées et Lioy et al en review). Ce sont des équivalents des TADs identifiés chez les eucaryotes. Ces CIDs forment un niveau d'organisation du chromosome à un niveau inférieur aux macrodomaines (voir la sous partie suivante). Les loci d'un domaine interagissent préférentiellement avec les loci du même domaine et peu ou faiblement avec les loci d'autres domaines (Le et al., 2013). Chez *C. crescentus*, ces CIDs sont pour certains délimités par la présence de gènes fortement transcrits de grande taille. En effet, en plus de la corrélation fréquente des bordures de domaine avec les localisations de gènes longs et fortement transcrits, la présence de rifampicine (qui inhibe la transcription) entraîne la disparition de presque toutes les bordures (Le and Laub, 2016; Le et al., 2013). De plus l'insertion d'un gène long fortement transcrit à une nouvelle localisation suffit à entraîner la formation d'une bordure (Le and Laub, 2016). Le surenroulement de l'ADN a initialement été proposé comme potentiellement impliqué dans la formation de ces bordures, les gènes hautement transcrits pouvant inhiber la diffusion de ce surenroulement (comme pour les domaines topologiquement isolés d'environ 10kb). En effet en présence de novobiocine qui inhibe certaines topoisomérases il y a moins de domaines et les barrières des domaines sont moins nettes (Le et al., 2013). Cependant il a été observé que cette inhibition de la diffusion du surenroulement de l'ADN est liée au niveau de transcription et non à la taille du gène, indiquant que les domaines de surenroulement et de Hi-C ne sont pas superposables. Une explication plus plausible serait que la présence de longs gènes hautement transcrits entraîne une décompaction et le déroulement local de l'ADN. Cette décompaction aurait pour conséquence d'éloigner physiquement les régions voisines d'ADN ce qui délimiterait les domaines (Le and Laub, 2016). Chez *B. subtilis*, 60% des bordures des CIDs coïncident avec des gènes hautement transcrits (12/20) ce qui corréle avec l'hypothèse émise chez *C. crescentus*. Une partie significative des 40% de bordures restantes corrèlerait avec des protéines qui se fixent à l'ADN ayant un rôle dans la condensation de l'ADN mais cela reste à confirmer (Marbouty et al., 2015).

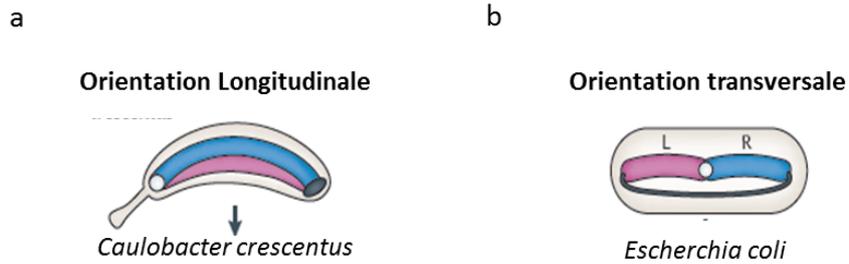


Figure 20: orientation longitudinale et transversale du chromosome

Schéma représentatif de l'organisation longitudinale et transversale des chromosomes bactériens. L'origine est en blanc, la région de terminaison en noir, le bras droit du chromosome en bleu et le bras gauche en rose

a. Orientation longitudinale du chromosome de *C. crescentus*

b. Orientation transversale du chromosome d'*E. coli*

(Wang and Rudner, 2014).

1.2.1.4 Macrodomaines

Chez *E. coli*, une étude par la technique de FISH (Fluorescent In Situ Hybridization), a d'abord révélé que certains loci chromosomiques sont fréquemment localisés dans le même espace cytoplasmique, mettant ainsi en évidence un domaine Ori et un domaine Ter (Niki et al., 2000). Un outil génétique dérivé de la recombinaison site-spécifique du phage lambda a ensuite été développé au laboratoire (Valens et al., 2004). Il a permis de mesurer la fréquence de collisions aléatoires entre différentes régions du chromosome. Les résultats obtenus ont mené à la définition de 4 macrodomaines (MD) génétiquement isolés (Ori, Ter, Right et Left), d'une taille de l'ordre du Mb, et deux régions non structurées (Non-Structured-Right ou NSR et Non-structured Left ou NSL) (Valens et al., 2004) (Figure 19). Les loci de ces MD interagissent avec les loci appartenant au même MD et avec les régions NS et interagissent peu ou pas avec les loci des autres MD (Valens et al., 2004). Les MD Ori et Ter identifiés en génétique correspondent aux domaines Ori et Ter préalablement mis en évidence par des expériences de FISH (Niki et al., 2000). Le MD le mieux caractérisé est le Ter. Des séquences répétées de 13pb appelées sites *matS*, présents uniquement dans le MD Ter, sont reconnues et fixées spécifiquement par la protéine MatP (Figure 19). L'interaction de MatP avec *matS* entraîne la formation du MD Ter (Mercier et al., 2008). Plus récemment des études réalisées au laboratoire ont montré que le MD Ori serait déterminé par une séquence unique de 17pb *maoS* située proche d'*oriC* et reconnue par la protéine MaoP, le mécanisme de structuration de ce MD par ces déterminants restant à identifier (Valens et al., 2016). Les MD Right et Left ainsi que les régions non-structurées, eux, sont définis par leur distance par rapport à *oriC* (Duigou and Boccard, 2017).

1.2.2 Organisation spatiale

En plus de l'organisation moléculaire dont les différents niveaux ont été décrits ci-dessus, une organisation spatiale du chromosome dans la cellule a été révélée grâce à l'amélioration des techniques de microscopie. Il y a en effet une orientation du chromosome dans la cellule et cette orientation respecte l'ordre des gènes sur le chromosome (Wang and Rudner, 2014).

1.2.2.1 Deux types d'orientations dans la cellule

Deux grands types d'orientations ont été observées chez les bactéries : transversale ou longitudinale (Figure 20).

- **Orientation transversale : *E.coli***

Chez *E. coli*, Le chromosome à une orientation transversale (*left-ori-right*) avec l'origine localisée au milieu de la cellule, les bras droit et gauche chacun d'un côté de la cellule et le terminus qui connecte les deux bras pour compléter le cercle. Après répllication des origines, les deux copies sont ségréguées jusqu'au $\frac{1}{4}$ et $\frac{3}{4}$ de la longueur de la cellule et les bras gauche et droit nouvellement répliqués ségrégent de chaque côté régénérant une orientation transversale (Nielsen et al., 2006; Wang and Rudner, 2014; Wang et al., 2006).

1. Organisation des chromosomes

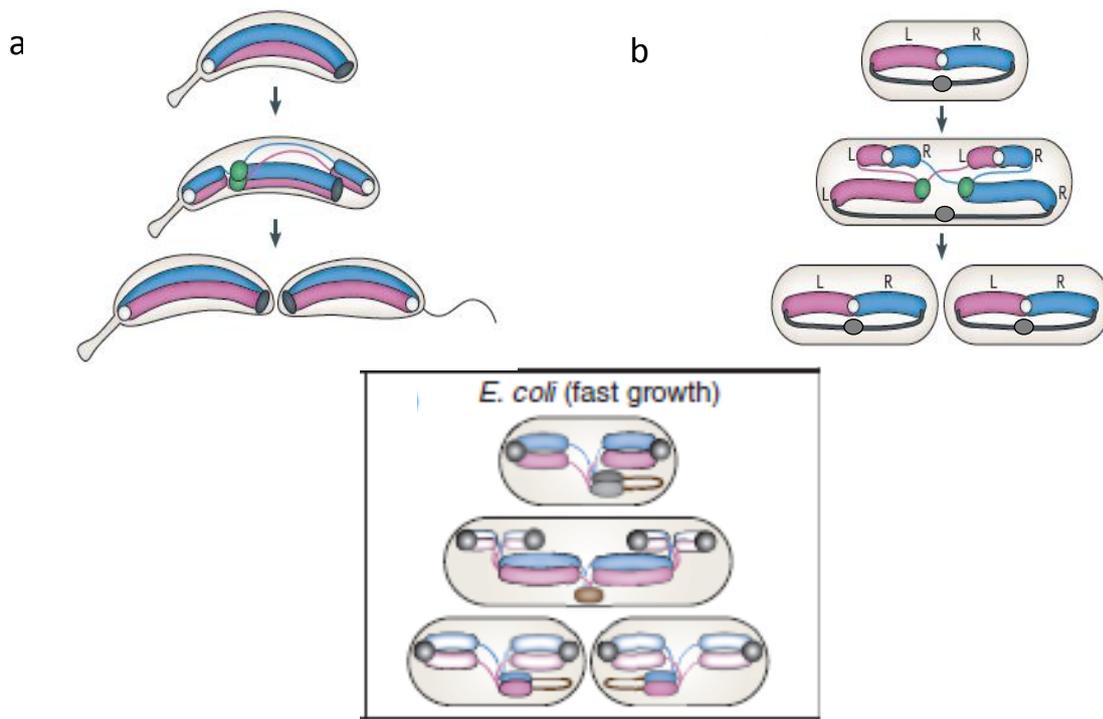


Figure 21: Différentes dynamiques de réplication selon l'orientation du chromosome.

Dans les 3 cas présentés ci-dessous, l'ADN non répliqué est en trait épais et plein, et l'ADN en cours de réplication en trait fin. L'origine est en blanc, la région de terminaison en noir.

a. Représentation d'un cycle de réplication (et de ségrégation de façon concomitante) du chromosome de *C. crescentus*. Chez cette bactérie le chromosome est orienté longitudinalement.

b. Représentation du cycle de réplication (et de ségrégation de façon concomitante) du chromosome orienté transversalement d'*E. coli*.

c. Un exemple de cycle plus compliqué : *E. coli* en condition de croissance rapide. (Wang and Rudner, 2014).

Selon des études récentes de 3C réalisées au laboratoire, une seule diagonale d'interaction correspondant à des interactions entre les loci proches sur le chromosome est observée sur la matrice de contact d'une souche WT (**Figure 21**) (Lioy *et al*, *under review*).

- **Orientation longitudinale**

D'autres bactéries, plus nombreuses, possèdent un chromosome orienté longitudinalement (orientation *ori-ter*) avec l'origine de réplication localisée à un pôle, le terminus à l'autre pôle de la cellule et les deux bras du chromosome entre les deux (**Figure 20**) (Wang and Rudner, 2014). C'est notamment le cas de *B. subtilis*. Chez cette bactérie, l'analyse de la position des réplisomes a montré que la réplication démarre au milieu de la cellule (Lemon and Grossman, 1998). Les origines nouvellement synthétisées migrent ensuite rapidement vers les pôles de la cellule suivie par le reste du chromosome (Lin and Grossman, 1998). Des études réalisées chez *C. crescentus* dont le chromosome est aussi orienté longitudinalement ont montré que chez cette dernière, contrairement à *B. subtilis*, la réplication démarre à un pôle de la cellule (Jensen *et al.*, 2001). De façon concomitante, l'une des deux origines nouvellement répliquée migre vers le pôle opposé suivie progressivement par le reste du chromosome (Jensen *et al.*, 2001) (**Figure 21**). Différentes dynamiques de réplication sont donc possibles pour une même orientation du chromosome. La mise au point des techniques HI-C chez *C. crescentus*, a mené au premier modèle en 3D d'un chromosome bactérien qui corrèle avec les études en microscopie (Umbarger *et al.*, 2011). Sur les matrices de contacts, on observe en effet deux diagonales d'interactions. La première diagonale indique des fréquences élevées d'interactions entre les loci proches sur le même bras du chromosome (comme la diagonale observée chez *E. coli*). La deuxième diagonale montre qu'il y a aussi des interactions entre les loci à des positions équidistantes d'*oriC* (un loci sur chaque bras du chromosome) bien qu'un peu moins fréquentes (Le *et al.*, 2013; Umbarger *et al.*, 2011). Le même type de résultats a été observé chez *B. subtilis* où les deux diagonales sont aussi observées (Wang *et al.*, 2015). Ces interactions entre les bras indiquent qu'ils sont alignés ce qui corrèle avec une organisation longitudinale. Chez *V. cholerae* qui comporte deux chromosomes, ils ont tous les deux une orientation spatiale de type longitudinale, mais des dynamiques de réplication différentes. (Ramachandran *et al.*, 2014).

- **Une orientation plus complexe chez certaines espèces**

Cette orientation dépend du cycle cellulaire et des conditions de croissance (Wang and Rudner, 2014), et chez certaines bactéries elle peut devenir plus complexe.

Lorsque *E. coli* est dans des conditions de croissance rapide, c'est-à-dire quand il y a plusieurs cycles de réplication en même temps, il semblerait que le chromosome ait une orientation *ori-ter* (longitudinale) au lieu de transversale. Dans ces conditions, les origines localisées au pôle se séparent, mais les bras sont alignés (Youngren *et al.*, 2014). Les réplisomes sont localisés au milieu de la cellule, ce qui indique qu'il pourrait y avoir une phase transitoire pendant laquelle le chromosome serait orienté transversalement (**Figure 21**).

Chez *P. aeruginosa* le chromosome est aussi orienté longitudinalement mais la réplication des chromosomes se fait au centre de la cellule entraînant un repositionnement du chromosome vers le centre de la cellule pour être répliqué. Après réplication, les deux copies des loci migrent chacune d'un côté de la cellule, jusqu'à ce que les deux copies de l'origine de réplication atteignent 20 et 80% de la longueur de la cellule (Vallet-Gely and Boccard, 2013). Cette localisation subpolaire est retrouvée chez *Myxococcus xanthus* (Harms et al., 2013). Les mécanismes impliqués dans cette localisation qui est particulière (la plupart des bactéries ont leurs origines localisées au pôle ou au $\frac{3}{4}$ $\frac{1}{4}$ de la longueur de la cellule) restent à déterminer. Les déterminants de l'orientation spatiale du chromosome ont été étudiés, particulièrement ceux de la configuration longitudinale. Les acteurs impliqués sont notamment les condensines bactériennes, le système de partition impliqué dans la ségrégation du chromosome et un ancrage du chromosome au pôle de la cellule chez certaines bactéries.

2. Ségrégation des chromosomes

Chez tous les organismes les chromosomes doivent impérativement être copiés fidèlement et les deux copies obtenues doivent être séparées chacune dans une cellule fille, afin d'assurer la transmission correcte de l'information génétique au moment de la division cellulaire.

Chez les eucaryotes cette séparation a lieu pendant la mitose (division cellulaire) qui se produit après la réplication. Les chromatides sœurs sont en effet maintenues ensemble après la réplication par des cohésines. Lors de cette mitose les centromères des chromatides sœurs sont attachés aux microtubules et elles sont ensuite tractées chacune vers un pôle de la cellule. Les cohésines agissent contre la force exercée par les microtubules et empêche la séparation des chromatides avant qu'elles ne soient toutes attachées via leur centromère. La destruction de ces cohésines entraîne la ségrégation des chromatides sœurs (Nasmyth, 2002).

Contrairement aux eucaryotes où la réplication et la ségrégation des chromosomes se font en 2 phases bien distinctes, chez les bactéries réplication et ségrégation sont concomitantes. Cette ségrégation des chromosomes bactériens peut-être divisée en 3 étapes : la ségrégation des origines de réplication, la ségrégation des bras du chromosome et une dernière étape de séparation des régions terminus et résolutions des problèmes éventuels (Badrinarayanan et al., 2015; Wang and Rudner, 2014).

2.1 Initiation de la ségrégation des chromosomes bactériens :

Les mécanismes de ségrégation des origines après réplication ont fait l'objet de nombreuses études. Dans le premier modèle imaginé, les deux copies de l'origine de réplication sont attachées à la membrane cellulaire et elles sont séparées par la croissance de la cellule (Jacob et al., 1963). Cependant, il est maintenant établi que l'incorporation de nouvelles molécules pour allonger la membrane de la bactérie ne se fait pas seulement au milieu de la cellule pour toutes les bactéries, mais peut aussi se faire tout le long de la bactérie (Nanninga, 1998).

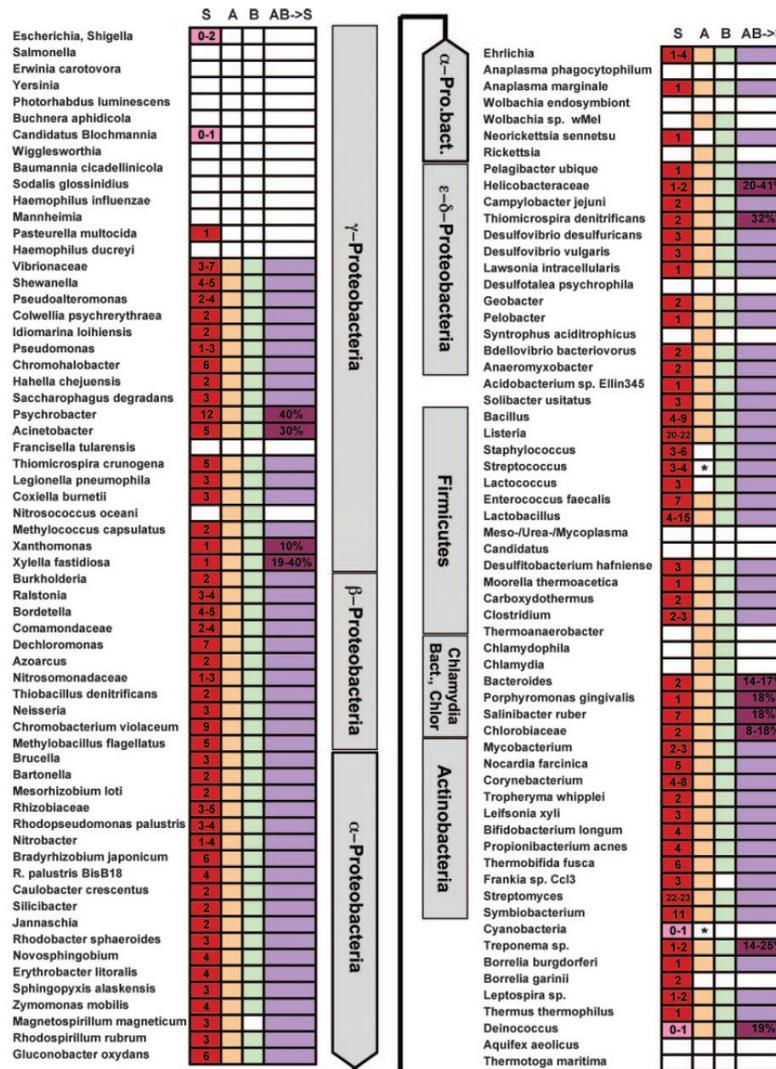


Figure 22: phylogénie du système ParABS

Les phylum et classes phylogénétiques sont indiqués en gris. Les chiffres indiqués dans la première colonne (S) indiquent le nombre de sites *parS* contenus dans les souches de chaque branche. Une case rouge indique que toutes les souches de la branche ont un site *parS*. Une case rose indique que seulement certaines souches de la branche ont un site *parS*. Une case vide indique qu'aucune souche de la branche ne contient de site *parS*. Dans les colonnes A et B, les cases sont colorées si toutes les souches d'une branche ont une séquence codant un homologue de ParA et de ParB respectivement. Les astérisques indiquent qu'une seule souche de la branche a une séquence codant un homologue de ParA ou de ParB. Dans la dernière colonne (AB->S), les cases colorées correspondent aux branches dans lesquelles pour toutes les souches, les 3 composants du système ParABS sont contenus dans une région correspondante à 10% de la taille du chromosome. Les branches pour lesquelles les cases sont plus foncées indiquent que la distance est de plus de 10% pour au moins une souche. La distance moyenne est indiquée par les pourcentages.

(Livny et al., 2007)

De plus, il a été observé par microscopie que le déplacement de l'origine de réplication est dix fois plus rapide que la croissance de la cellule (Fiebig et al., 2006; Viollier et al., 2004; Wang et al., 2006). Ce modèle ne peut donc pas expliquer la ségrégation des origines.

Un autre modèle a suggéré que la réplication du chromosome soit impliquée dans la ségrégation. Chez *B. subtilis* il a été proposé que le réplisome situé au milieu de la cellule tire l'ADN non répliqué vers lui et pousse ensuite l'ADN répliqué de part et d'autre. Ce modèle est appelé « capture-extrusion » (Bates & Kleckner, 2005; Jensen et al., 2001). Il ne peut pas être appliqué à toutes les bactéries, car par exemple chez *C. crescentus*, le réplisome se déplace le long du chromosome et ne reste pas au milieu de la cellule.

Dans les années 1980, des systèmes dits de partition ont été identifiés d'abord pour des plasmides puis pour les chromosomes bactériens (Austin et al., 1985; Ireton et al., 1994). Deux groupes de bactéries ont ainsi été définis: un groupe majoritaire qui possède ce type de système sur leur chromosome. Des homologues de ces systèmes ont en effet été retrouvés dans 65% des génomes bactériens ainsi présents chez une partie de γ -protéobactéries et chez la plupart des α et β -protéobactéries, des firmicutes, des chlamydia et des actinobactéries (Livny et al., 2007). Ils ont été caractérisés chez plusieurs bactéries et sont impliqués dans la ségrégation des origines de réplication (Figure 22) (Ptacin et al., 2010). Le deuxième groupe de bactéries, plus minoritaire, ne possède pas de système de partition. C'est notamment le cas de deux branches des *gamma-protéobactéries* qui comprennent les *Escherichia*, *Yersinia*, *Salmonella*, *Buchnera* et *Haemophilus* et d'une branche des *Firmicutes* incluant les *Mesoplasma*, *Mycoplasma*, *Ureaplasma*, *Candidatus* (Livny et al., 2007).

2.1.1. Ségrégation des origines chez les bactéries ayant un système de partition.

Les systèmes de partition sont en général composés de 3 éléments, une NTPase et une protéine qui se fixe sur une séquence ADN spécifique (centromère-like) qui constitue le troisième élément du système. Trois types de systèmes de partition (type I, type II, type III) ont été identifiés chez les bactéries, comme étant impliqués dans la ségrégation des plasmides ou des chromosomes bactériens. (Brooks and Hwang, 2017).

Dans les systèmes de types II ou ParRMC, ParR se fixe spécifiquement sur *parC*. ParM est une ATPase structuralement similaire à l'actine eucaryote. Elle polymérise et forme des filaments. Des études *in vivo* ont montré que ces filaments dynamiques séparent les plasmides en les poussant chacun vers un pôle de la cellule (Campbell and Mullins, 2007; Ebersbach and Gerdes, 2005). Les systèmes de type III ou TubZRC, consistent en une GTPase TubZ et une protéine TubR qui reconnaît spécifiquement les séquences *tubC*. Les monomères de TubZ s'assemblent à l'extrémité positive des filaments et se désassemblent du côté négatif (tapis roulant) (Fink and Löwe, 2015; Larsen et al., 2007). Les mécanismes exacts de ségrégation impliquant ces filaments restent inconnus.

Le système de type I est à la fois impliqué dans la ségrégation de certains plasmides (notamment pour les plasmides P1 et F d'*E. coli*) et a aussi un rôle dans la ségrégation des chromosomes bactériens.

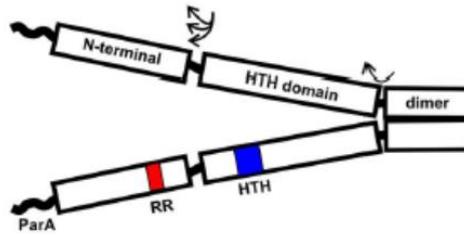


Figure 23: Structure de ParB

Structure de la protéine ParB avec le domaine N-terminal permettant l'interaction avec ParA, Le domaine HTH d'interaction avec l'ADN et le domaine C-terminal de dimérisation. Les trois domaines sont liés par des liens flexibles (flèches noires). Le trait noir en forme de vague représente la région d'interaction avec ParA dans la plupart voir toutes les protéines ParB. Le patch arginine très conservé entre les espèces est indiqué en rouge, et le motif HTH en bleu.

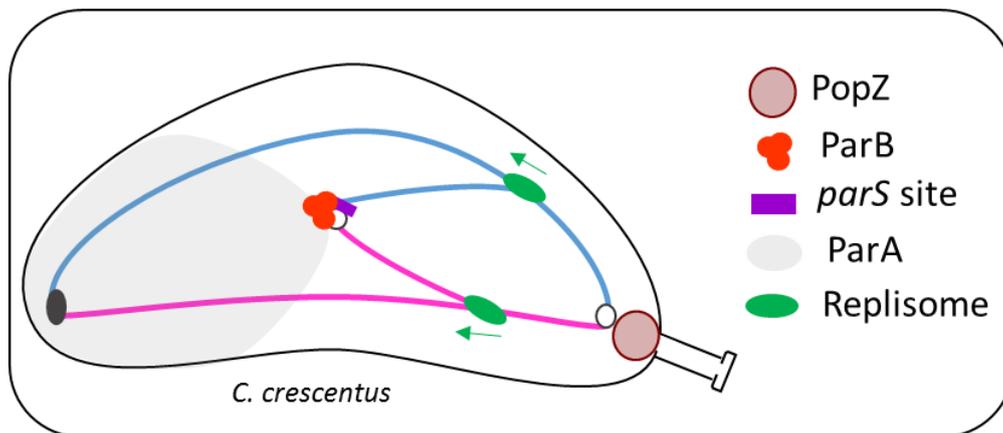


Figure 24: le système ParABS chez *C. crescentus*.

Une fois l'origine répliquée, l'une des deux copies migre vers le pôle opposé via le système ParABS. ParB (en rouge) reconnaît spécifiquement les séquences *parS* (en violet). ParB lié aux séquences *parS* interagit avec l'ATPase ParA (en gris clair).

Les réplisomes qui sont indiqués en vert, répliquent le chromosome depuis l'origine en suivant les deux bras, jusqu'au site de terminaison.

Le chromosome est ancré au « vieux » pôle par la protéine popZ (cf partie ancrage)

Adapté de (Wang and Rudner, 2014).

Le mécanisme de fonctionnement de ce type de système est le moins connu. Des détails concernant les systèmes de partition chromosomiques sont donnés ci-après.

2.1.1.1. Ségrégation des chromosomes bactérien - système de partition de type I

Les systèmes de type I sont composés d'une ATPase ParA (*soj* chez *B.subtilis*) et d'une protéine ParB (*Spo0J* chez *B.subtilis*) qui se fixe sur l'ADN sur une ou des séquences spécifiques nommées *parS*. (**Figure 24**).

▪ Les séquences *parS*

Les séquences dites centromériques spécifiques des systèmes de partition chromosomiques bactériens, ont d'abord été identifiées chez *B. subtilis* (Lin and Grossman, 1998). 8 séquences *parS* ont ainsi été identifiées comme étant fixées par ParB par immunoprécipitation de la chromatine (ChIP-chIP). Ces séquences palindromiques sont toutes localisées dans les 20% du chromosome autour de l'origine de réplication. Ces séquences ont ensuite été identifiées dans 17 autres génomes de bactéries à partir de la séquence consensus identifiée chez *B.subtilis* : 5'-TGTTNACGTGAAACA-3' (Lin and Grossman, 1998). Le nombre de site *parS* est extrêmement variable. Ainsi, Chez *C. crescentus*, un site *parS* est retrouvé (Toro et al., 2008), chez *V. cholerae*, le ChrI possède 3 sites *parS* regroupés à côté d'*oriC1* (Yamaichi et al., 2007), quand 24 sites ont été identifiés chez *M. xanthus* (Harms et al., 2013) (**Figure 22**). Chez *P. aeruginosa* 4 sites *parS* sont localisés dans les 15kb à droite d'*oriC* (Livny et al., 2007).

En 2007, une étude a montré que 69% des espèces bactériennes possèdent des séquences *parS* spécifiques. Ces séquences sont le plus souvent proches de l'origine de réplication. 92% sont en effet localisées dans les 15 % du chromosome autour d'*oriC* (Livny et al., 2007).

▪ les protéines ParB ou protéine se fixant sur les séquences *parS*

Les protéines ParB des chromosomes sont du type hélice-tour-hélice. Ces protéines partagent une organisation en domaines similaire comprenant 3 régions : Un domaine de dimérisation en C-terminal, un motif HTH central pour sa fixation sur les séquences ADN *parS*, et un domaine N-terminal pour l'oligomérisation des protéines et l'interaction avec ParA (stimulation de l'hydrolyse de l'ATP) (Funnell, 2016) (**Figure 23**). Deux régions du domaine N-terminal, BoxI et BoxII sont très conservées entre les espèces (Yamaichi and Niki, 2000).

Chez plusieurs bactéries l'étude de la fixation de ParB sur le chromosome a montré que des dimères de ParB se fixent fortement sur ses sites spécifiques, mais que cette fixation s'étend aussi sur 10-20 kb autour du ou des sites (sa fixation diminue progressivement avec la distance au site *parS*) (Breier & Grossman, 2007; Murray, Ferreira, & Errington, 2006; Sanchez et al., 2015). Ce phénomène, appelée « spreading » de ParB peut être responsable de la régulation de l'expression des gènes localisés à côté des sites *parS*.

Il a d'abord été identifié pour les plasmides, notamment les plasmides F et P1 d'*E.coli*. En effet, il a dans un premier temps été observé que la surexpression de la protéine SopB (homologue de ParB) du plasmide F entraîne la répression des gènes voisins du site *sopC* (*parS*). Ce « spreading » a ensuite été directement montré par des expériences de CHIP de ParB du plasmide P1 (Lynch and Wang, 1995; Rodionov et al., 1999). Ensuite ce phénomène a été retrouvé pour plusieurs bactéries. Il a en effet été montré que l'expression de la protéine ParB de *P. aeruginosa* dans une souche *E.coli* possédant un plasmide qui contient un site *parS* à proximité de gènes régulant la réplication, peut entraîner la perte du plasmide. ParB régulerait donc l'expression des gènes localisés autour de *parS* (Bartosik et al., 2004). Le même type d'analyses réalisées avec différents mutants de ParB ont permis de montrer que cette régulation nécessite la présence du domaine HTH, du domaine de dimérisation de ParB et du domaine N-terminal (sauf les 18 premiers acides aminés). Il n'y en effet pas de perte du plasmide chez ces mutants (Bartosik et al., 2004). Des études de CHIP-chIP et de CHIP-seq ont ensuite permis d'identifier ce « spreading » chez *B. subtilis* (Breier and Grossman, 2007). L'étude de mutants de ce « spreading » de ParB chez plusieurs bactéries a permis de montrer que celui-ci est important pour la fonction de ParB dans la ségrégation des chromosomes. Ainsi chez *B.subtilis* des marquages au DAPI, ont montré qu'un mutant de « spreading », Spo0J93, à un pourcentage de cellules anucléées de 1 à 2 % contre 0,02% en WT soit 100 fois plus de cellules anucléées. Chez ce même mutant ScpB-GFP et SMC-GFP ne peuvent pas former de foci au niveau de l'origine indiquant que chez *B. subtilis*, sans « spreading » ParB ne peut pas charger SMC sur le chromosome (Graham et al., 2014). Chez *P. aeruginosa*, des mutants du domaine HTH ou du domaine N-terminal présentent eux aussi un fort pourcentage de cellules anucléées allant de 1,2 à 2,4% contre <0,03% en conditions sauvages donc 50 à 80 fois plus de cellules anucléées (Kusiak et al., 2011).

Les mécanismes exacts de ce « spreading » sont inconnus, mais plusieurs possibilités ont été proposées pour l'expliquer. Initialement, la première hypothèse était que ce « spreading » soit due à la polymérisation latérale de ParB menant à la formation d'un long filament (1D) (Rodionov et al., 1999). Ce modèle a notamment été suggéré par des expériences de CHIP réalisées chez *B.subtilis* après insertion à côté d'un *parS*, de la séquence spécifique *xyfO* de fixation de la protéine XylR à l'ADN. Les résultats de ces expériences montraient en effet que la fixation de ParB, du côté du *parS* où est situé *xyfO*, est fortement réduite donc que le « spreading » était réduit. XylR formerait donc une barrière pour le « spreading » ce qui confirmait l'hypothèse du modèle (Murray et al., 2006). Cependant d'autres études chez la même bactérie ont montré que la concentration de ParB serait insuffisante pour un tel modèle au vue du « spreading » observé. En effet étant donné que ParB occupe 10-20 kb d'ADN autour de *parS* et qu'il a été montré qu'une protéine ParB occupe 30 pb, cela veut dire qu'il faudrait au moins plusieurs centaines de ParB par site *parS* (Murray et al., 2006). Des immunoblots quantitatifs ont permis de déterminer la quantité de ParB dans la cellule (Graham et al., 2014).

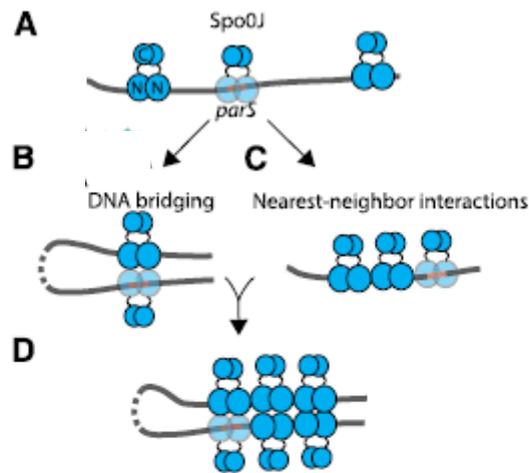


Figure 25: modèle de “spreading” de ParB

Les différentes étapes de formation du complexe nucléoprotéique par ParB (Spo0J chez *B. subtilis*). Les domaines N et C terminaux de Spo0J sont en bleu sur le schéma. ParB se fixe spécifiquement sur l’ADN au niveau du site *parS* et se fixe aussi non spécifiquement (plus faiblement) **(A)**. Ensuite des dimères de ParB interagissent ensemble ce qui forme des ponts d’ADN (« bridging ») **(B)** et des dimères voisins peuvent aussi interagir entre eux **(C)**. L’ensemble de ces interactions entre dimères mènent à la formation d’un large complexe **(D)**.

(Graham et al., 2014)

Les résultats indiquent qu'il y a en moyenne 440 molécules de ParB (dimères) et 24 sites *parS* (plusieurs origines dans la même cellule) soit 20 ParB par site *parS*, donc pas suffisamment pour correspondre au modèle évoqué précédemment (cela reviendrait à un « spreading » sur 500 pb seulement) (Graham et al., 2014). Plus récemment, deux autres modèles ont été proposés. Le premier serait que la fixation latérale de ParB sur une distance limitée, combinée à des boucles ou des ponts intra ou intermoléculaires, forment un large complexe réunissant de nombreuses protéines ParB (Graham et al., 2014). Des études en microscopie à molécule unique ont été réalisées pour étudier la compaction de l'ADN par ParB de *B. subtilis in vitro*. Pour cela, de l'ADN du phage lambda a été fixé par une de ses extrémités dans une cellule d'écoulement utilisée pour la microscopie. Ces études réalisées en présence d'un intercalant de l'ADN (SYTOX-orange) ont permis d'observer la compaction de l'ADN par ParB. Le marquage du SYTOX est en effet modifié en présence de ParB avec la formation d'un focus de plus grande taille au lieu de plusieurs petits (Graham et al., 2014). Le mouvement de l'ADN a été suivi plus précisément en marquant les sites EcoRI de l'ADN de lambda avec des « quantum dots » ou QDs qui permettent de suivre plus précisément le mouvement de l'ADN (« DNA motion capture »). Les résultats montrent que suite à la fixation de ParB, l'ADN est compacté d'abord par son extrémité libre (Graham et al., 2014). La fixation de ParB sur l'ADN a ensuite été observée plus directement via un marquage de ParB (Cy3-maleimide) placé en C-terminal ; (il a été vérifié que cette étiquette n'a pas d'impact sur la fonction de ParB *In vivo*). L'observation simultanée de l'ADN ayant les sites EcoRI marqués par les QDs et de ParB-Cy3 en fluorescence a révélé que ParB se fixe non spécifiquement à l'ADN. Il n'y a pas d'enrichissement détecté au niveau de *parS*, ce qui corrèle avec une fixation rapide et non spécifique de ParB qui compacte l'ADN. ParB formerait des ponts (boucles) selon les images de microscopie (ParB-Cy3) qui montrent que des segments d'ADN fixés par ParB restent collés l'un à l'autre après collisions (Graham et al., 2014). La compaction de l'ADN par ParB commence seulement après une fixation suffisante de ParB sur l'ADN. L'ensemble de ces expériences ont mis en évidence le « bridging » de ParB qui lui permet de piéger des boucles d'ADN. Cette activité de ParB pourrait expliquer que 20 dimères de ParB chez *B. subtilis* peuvent occuper 10-20kb d'ADN adjacent au site *parS in vivo* (Graham et al., 2014). L'activité de « bridging » de ParB a ensuite été étudiée *in vivo*. Des mutants de ce « bridging » ont été analysés via de la microscopie à fluorescence, des CHIP-seq. Les résultats montrent que ces mutants sont incapables de « spreading ». En effet, il n'y a pas de formation d'un foci intense au niveau d'*oriC* et la fixation de ParB n'est pas étendue autour du site *parS* chez ces mutants (Graham et al., 2014).

Ces différentes études ont permis d'élaborer un modèle pour le « spreading » de ParB. Ainsi une combinaison d'interactions protéines/protéines à longue distance (formant des ponts entre des régions d'ADN) et à plus courte distance, formerait un complexe de ParB qui s'étendrait sur plusieurs kb (Graham et al., 2014) et serait ainsi responsable du « spreading » (Figure 25).

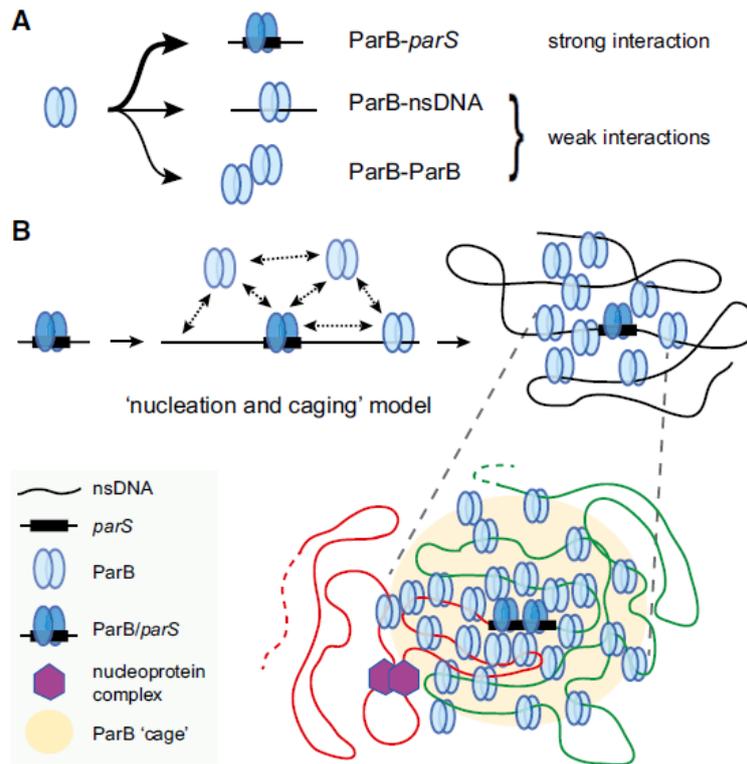


Figure 26: Modèle de « nucleation and caging »

(A) Les différentes interactions de ParB qui interagissent fortement avec *parS* (bleu foncé) et faiblement avec l'ADN non spécifique et avec d'autres protéines ParB (bleu clair).

(B) Le modèle de « nucleation and caging ».

Les interactions fortes de ParB avec *parS* et faibles avec d'autres ParB liés non spécifiquement à l'ADN et d'autres protéines ParB entraînent la formation d'une zone de confinement de ParB. Toutes ces interactions défavoriseraient la diffusion de ParB loin du complexe ParB/*parS*. Ces interactions regrouperaient donc les molécules de ParB autour de ce complexe (ParB « cage » en jaune).

Les traits verts et rouges représentent l'ADN situé à droite et à gauche du *parS* respectivement. Des complexes nucléoprotéiques (hexagones violets) pourraient réduire la proximité spatiale de l'ADN des régions entourant le complexe de partition, ce qui pourrait expliquer l'asymétrie de la fixation de ParB de chaque côté du complexe ParB/*parS*.

(Sanchez et al., 2015)

Selon des expériences du même type réalisées avec des protéines ParB de *P. aeruginosa* et *V. cholerae*, ce « bridging » serait conservé chez ces bactéries (Graham et al., 2014). Les résidus de ParB impliqués dans ce « spreading » selon ce modèle ont été étudiés. Des cribles de mutants, des expériences de ChIP-seq et de microscopie, ont révélé l'importance d'un motif arginine pour ce « spreading ». Ce motif, très conservé entre les protéines ParB, est situé dans la BoxII du domaine N-terminal (Yamaichi and Niki, 2000). Récemment, la structure par cristallographie de la protéine ParB de *Helicobacter pylori* liée aux *parS* (avec l'extrémité C-terminal de ParB tronquée) a été obtenue (Chen et al., 2015). La comparaison de cette structure avec la structure d'une protéine ParB cristallisée en l'absence d'ADN a révélé un changement de conformation de ParB qui autoriserait les dimères de ParB à interagir en *cis* et en *trans* (Chen et al., 2015; Leonard et al., 2004). Ce changement de configuration corrèle avec le modèle de « spreading » évoqué précédemment qui requiert des interactions en *trans* pour le « bridging » de ParB, et des interactions entre dimères de ParB proches ou interactions en *cis* (Graham et al., 2014). A partir de la structure cristallisée de *H. pylori*, une carte 2D réalisée bio-informatiquement pour la protéine ParB de *B. subtilis*, a permis d'identifier d'autres résidus impliqués dans les interactions intermoléculaires en *cis* ou en *trans* et donc potentiellement dans le « spreading » (Song et al., 2017). En comparant ces résidus avec les séquences les plus conservées entre les protéines ParB, certains des résidus identifiés sur la carte ont été choisis pour réaliser des études plus approfondies en plus des résidus du patch arginine. Des mutants des résidus choisis ont été construits (patch arginine + résidus sélectionnés de la carte 2D) puis étudiés plus en détails par des études de microscopie en fluorescence, de microscopie en molécule unique et de tests de fixation à l'ADN. Les observations en microscopie ont permis de montrer que certains de ces mutants sont incapables de former des foci comme c'est le cas en WT, d'autres ne le sont que partiellement. Ils sont donc déficients partiellement ou totalement pour le « spreading » (Song et al., 2017). Ces mutants ont en fait pu être classés en 3 groupes : les mutants du premier groupe qui inclut les mutants des résidus du patch arginine, sont déficients pour le « bridging » de ParB donc ne peuvent former le complexe de ParB permettant le « spreading ». Ces mutants ont été détectés via des analyses de la compaction de l'ADN en microscopie en molécule unique. Ensuite, des analyses par fluorométrie à balayage différentiel, qui permet d'obtenir les courbes de dénaturation de chaque mutant ont été effectuées. Si les mutants des groupes I et III ont une courbe de dénaturation similaire à la WT, la mutation des résidus de ParB, localisés dans la première moitié de la BoxII ont une courbe différente. Ces résultats indiquent qu'ils sont moins stables thermiquement et donc moins bien repliés que la protéine WT. Ce mauvais repliement de ParB impacterait sa dimérisation et donc le « spreading » (et cela impacterait aussi sa fixation au site *parS*). Ces mutants forment le groupe II de mutants. Enfin le groupe III de mutants de ParB ne présente ni problème de repliement ni problème de fixation de ParB à l'ADN. Les raisons de l'atteinte du « spreading » chez ces mutants restent à élucider (Song et al., 2017).

Un modèle alternatif a été décrit pour le plasmide F d'*E.coli* (ce plasmide possède un système de partition de type I, dont la protéine ParB est aussi capable de « spreading ») (Sanchez et al., 2015) mais il serait aussi valable pour les chromosomes bactériens (non publié). Pour arriver à ce modèle, la localisation de ParB (ParB du plasmide F) a été étudiée via de la microscopie à haute résolution. Ce type de microscopie, permet de déterminer la localisation des complexes au nanomètre près et de quantifier (au niveau d'une molécule unique) le nombre de protéine ParB dans et en dehors de ces complexes au cours du temps. Un foci de ParB au milieu de la cellule (ou deux au $\frac{1}{4}$ $\frac{3}{4}$ dans les cellules ayant déjà répliqué leurs origines) est observé (comme en microscopie à fluorescence) et quelques molécules sont détectées en dehors du ou des foci (Sanchez et al., 2015). Le suivi de cette localisation au cours du temps, a montré que même si ParB est localisé principalement au niveau de ces foci, le complexe de partition a une dynamique à l'échelle de la minute ou de la seconde. La quantification indique qu'en moyenne 90% des molécules ParB de la cellule sont concentrées au niveau du système de partition. L'excès de molécules de ParB (non fixé sur l'ADN) serait donc majoritairement confiné au niveau des complexes de partition. Des expériences de CHIP-seq ont par ailleurs montré que la fixation de ParB sur le plasmide est très forte au niveau de *ParS*, puis diminue abruptement (Sanchez et al., 2015). La fixation s'étend sur 5kb à gauche et 15kb à droite (ParB ne pourrait pas diffuser vers la gauche en raison de la présence des sites de fixation d'une protéine impliquée dans la réplication), mais elle est 2,5 fois moins forte qu'au niveau du site *parS*. Selon des prédictions statistiques réalisées dans cette étude, cette fixation observée ne pourrait correspondre au modèle de « bridging » de ParB proposé précédemment (Broedersz et al., 2014; Sanchez et al., 2015).

Cette étude propose donc un nouveau modèle en s'appuyant sur le fait que ParB est localisé en un focus confiné autour du *parS* et peut se fixer non spécifiquement sur l'ADN à l'intérieur du focus. Dans ce modèle, le regroupement de ParB autour du site *parS* serait donc expliqué par un réseau stochastique de molécules de ParB (Sanchez et al., 2015). Plus en détails, des dimères de ParB se fixent avec une forte affinité sur un nombre limité de sites *ParS*. Ces sites fixés par ParB forment alors des centres de « nucléation » qui attirent la plus large partie de ParB cellulaire. Ensuite l'interaction des dimères de ParB avec de l'ADN non spécifique et d'autres dimères de ParB mènent à « l'enroulement » (entrapment) de ParB autour des *parS* (3D). Des expériences de retard sur gel (EMSA) ont en effet permis de mettre en évidence des interactions entre dimères de ParB et des interactions entre ParB et l'ADN. ParB se fixe donc avec une faible affinité sur les régions entourant les sites *parS* (ADN non spécifique) comme le montre des analyses de footprint et cette fixation n'est pas stabilisée par la fixation de forte affinité à *parS*. (Sanchez et al., 2015). Ces interactions de faibles affinités dans ces régions de haute concentration de ParB doivent être très fréquentes. Même si des protéines ParB se dissocient, elles doivent se retrouver piégées au milieu de nombreuses interactions de faibles affinités et d'autres dimères de ParB confinés autour des *parS*. Cette haute fréquence d'interactions protéines-protéines et protéines-ADN ancrées au « centromère » et la conformation de l'ADN favorisant le confinement de ParB autour du *parS*, mènent à un effet dit de « caging ».

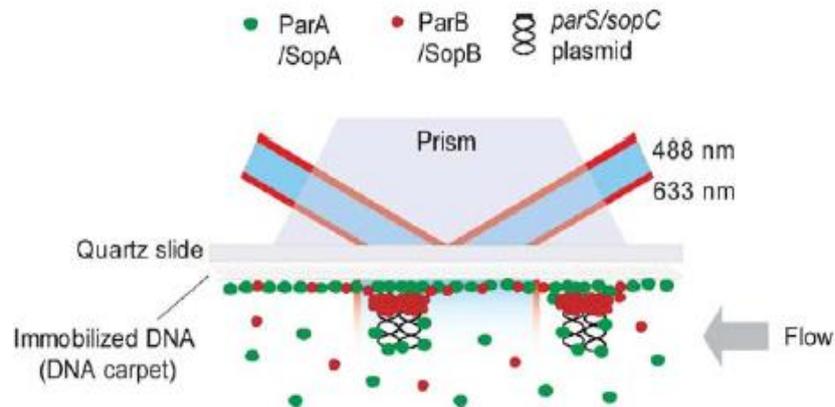


Figure 27: Schéma de la cellule d'écoulement utilisée pour reconstituer le système de partition du plasmide P1 in vitro.

L'ADN de lambda biotinylé (gris clair) est fixé sur une lame de quartz (gris plus foncé) après lavage de la cellule d'écoulement avec un tampon contenant de la Neutravidine (qui permet la fixation de l'ADN biotinylé à la lame). Pour mimer le confinement radial dans la cellule d'écoulement, une bicouche lipidique couvre la cellule d'écoulement (non représentée ici).

Le système Prism utilisé pour la microscopie est représenté au-dessus de la cellule.

(Hwang et al., 2013)

C'est le modèle de « nucleation and caging ». Contrairement aux deux premiers modèles, ce troisième modèle ne nécessite pas la formation d'un filament de ParB (**Figure 26**) (Sanchez et al., 2015).

Indépendamment de ce spreading, ParB peut réguler l'expression de gènes en se fixant de façon non spécifique sur l'ADN. Chez *V. cholerae*, l'expression de certains gènes localisés en dehors des zones de « spreading » change en l'absence de ParB1 (chromosome 1). Les fonctions de ces gènes sont variables, le gène *ompU* codant pour une protéine de la membrane externe, et le gène *VC0076* codant une protéine de stress sont notamment régulées par ParB1 (Baek et al., 2014).

- **ParA/modèles de mécanismes de ségrégation via ParABS.**

L'ATPase ParA, troisième élément du système ParABS sert de moteur au système ParABS. Différents modèles concernant son action sont proposés. Le premier modèle proposé impliquait des filaments de ParA qui poussent ou tirent les deux copies du chromosome de chaque côté de la cellule (Fogel and Waldor, 2006; Ptacin et al., 2010). Ce modèle a été abandonné car il a été montré que chez *C. crescentus*, ParA-ATP ne forme pas une structure linéaire, mais que des dimères de ParA-ATP se fixent sur le chromosome loin du complexe ParB-*parS*. De plus, ParB lié au *parS* ne suit pas une trajectoire linéaire (Lim et al., 2014).

Un autre modèle, dit de « diffusion ratchet » a ensuite été proposé et d'abord pour les plasmides P1 et F d'*E.coli*. Des études ont été réalisées pour ces plasmides à l'aide d'un système *in vitro*. Pour cela, des molécules d'ADN du phage λ ont été fixées par leur extrémité C-terminale à une cellule d'écoulement (**Figure 27**). Des analyses en microscopie TIRFM (Total Internal Reflection Fluorescence Microscopy) qui permet d'examiner seulement la fluorescence de la surface de l'échantillon, ont été réalisées à partir de ce système en utilisant une version fluorescente de ParA (Vecchiarelli et al., 2010). Il a ainsi été montré que ParA se fixe à l'ADN non spécifiquement en présence d'ATP. L'étude de mutants de différents résidus de ParA a montré que cette fixation non spécifique de ParA-ATP sur l'ADN est nécessaire pour l'activité de partition. Par ailleurs des analyses de fluorescence du tryptophane (ParA contient un résidu tryptophane proche de l'interface de fixation du dimère à l'ADP mais éloigné du site de fixation de l'ATP) ont montré deux transitions ou changements de conformation de ParA. La première transition (2-50s), visible par une augmentation de la fluorescence, correspondrait à la fixation de l'ATP qui induit un changement de conformation. La deuxième transition, beaucoup plus longue (10 min) et caractérisée par une lente diminution de la fluorescence est proposée comme permettant à ParA-ATP de passer dans un état stable. Cette deuxième transition a pour conséquence un délai temporel pour ParA avant de pouvoir se refixer à l'ADN (Vecchiarelli et al., 2010).

Les interactions entre ParA et les autres composants du système de partition ont ensuite été analysées dans une autre étude plus récente (Hwang et al., 2013) à l'aide d'une reconstitution du système ParABS du plasmide P1 *in vitro*.

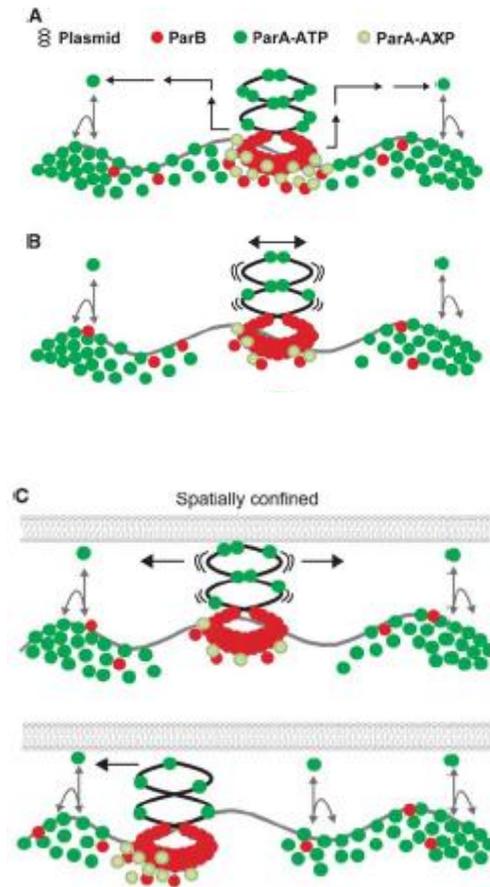


Figure 28: modèle du “diffusion-ratchet”

(A) ParB (en rouge) se fixe sur l’ADN plasmidique (en noir) au niveau du site *parS* et se fixe aussi non spécifiquement sur le DNA-carpet (recouvert d’ADN de λ). ParA-ATP est ensuite converti en ParA-ADP et se détache du DNA-carpet dans la région avoisinante du complexe de partition. Le temps nécessaire au changement de ParA-ADP en ParA-ATP nécessite un délai qui permet à ParA de diffuser avant de refixer au DNA-carpet.

(B) la stimulation par ParB du détachement de ParA du DNA-carpet réduit les points d’ancrage entre le plasmide et le « DNA-carpet » et le plasmide commence à bouger. Ce mouvement accélère le détachement de ParA localement du DNA-carpet créant une zone dépourvue de ParA. Dans le cas où il n’y a pas de confinement radial, le plasmide finit par se détacher et la zone dépourvue de ParA est remplie progressivement de nouvelles molécules de ParA.

(c) En cas de confinement radial (ce qui est le cas des bactéries du fait du faible écart entre la membrane et le nucléoïde), lorsque le plasmide se détache du DNA-carpet, il dérive stochastiquement dans une direction renforcée par la présence d’une plus forte concentration de ParA.

(Hwang et al., 2013)

Pour cela des versions fluorescentes de ParA, ParB et du plasmide (codant pour *parS*) ont été introduites dans une cellule d'écoulement contenant un tapis d'ADN ou « DNA carpet » qui mime la surface du nucléoïde. La dynamique du système a ensuite été étudiée en TIRFM. Des expériences en présence de ParA et ParB, mais sans le plasmide contenant la séquence *parS*, ont permis d'étudier la fixation non spécifique de ces deux protéines à l'ADN. Il a été observé que lorsque ParB est présent, la fixation non spécifique de ParA sur l'ADN diminue indiquant que ParB pourrait empêcher cette fixation (Hwang et al., 2013). La quantité de protéines ParB fixée au « DNA-carpet » est plus faible que celle de ParA. En présence de ParB, le temps de régénération de ParA-ATP augmente ce qui indique que ParB stabiliserait les interactions de ParA avec le « DNA carpet ». Donc ParB pourrait induire un changement de conformation de ParA-ATP qui stabiliserait temporairement les interactions ParA-ADN. Ce changement de conformation mènerait ensuite à l'accélération de l'hydrolyse de l'ATP et à la dissociation de ParA de l'ADN autour du complexe de partition (car c'est là que la concentration en protéine ParB est la plus élevée) (Hwang et al., 2013). Le fait que le taux d'échange ATP-ADP soit plus faible en présence de ParB indique que ParB inhiberait aussi la fixation de ParA en solution sur l'ADN et ParA resterait en solution pendant un temps plus long avant de refixer l'ADN. Des expériences ont ensuite été réalisées en présence de ParA, ParB et cette fois-ci en présence d'un plasmide codant pour une séquence *parS* en concentration équivalente. Dans ces expériences, la quantité de ParA-GFP observée en microscopie diminue au cours du temps. Quand la quantité de ParB/*parS* liés à ParA-GFP devient trop basse, les complexes ParB/*parS* se détachent, indiquant que ParA est un facteur limitant. Ainsi il se forme une région dépourvue de ParA (hydrolyse accélérée par ParB) ou zone de déplétion. Certains complexes de partition se déplacent vers la limite de cette zone de déplétion avant d'être détachés. Une fois le complexe détaché, il dérive dans une direction vers une plus forte concentration de ParA et ne revient pas dans l'autre direction du fait de la zone de déplétion de ParA. Ces résultats indiquent que le gradient de ParA peut suffire au transport directionnel de complexes de partition (Hwang et al., 2013). La comparaison d'analyses en présence et en absence de *parS*, montre que la fixation de ParB sur le site *parS* augmente la concentration de ParB locale au niveau du complexe de partition. De cela résulte une stimulation locale et efficace de l'activité ATPase de ParA autour du complexe de partition permettant au complexe de se déplacer (Hwang et al., 2013). Le même type de dynamique a été obtenue avec les éléments du complexe de partition du plasmide F (Vecchiarelli et al., 2013).

A partir de ces données, le modèle de « diffusion-ratchet » a été proposé. Dans ce modèle, un gradient de ParA sert de moteur pour le transport des copies d'ADN. ParB lié au(x) site(s) *parS* interagirait avec ParA-ATP fixé non-spécifiquement à l'ADN et stimulerait l'hydrolyse de l'ATP et donc le détachement de ParA de l'ADN. Un délai temporel empêcherait ParA de se refixer à l'ATP et donc à l'ADN immédiatement après s'être désassemblé (après hydrolyse de l'ATP). Ce délai aurait pour conséquence la diffusion de ParA dans la cellule et défavoriserait la fixation de ParA-ATP au même endroit sur le chromosome.

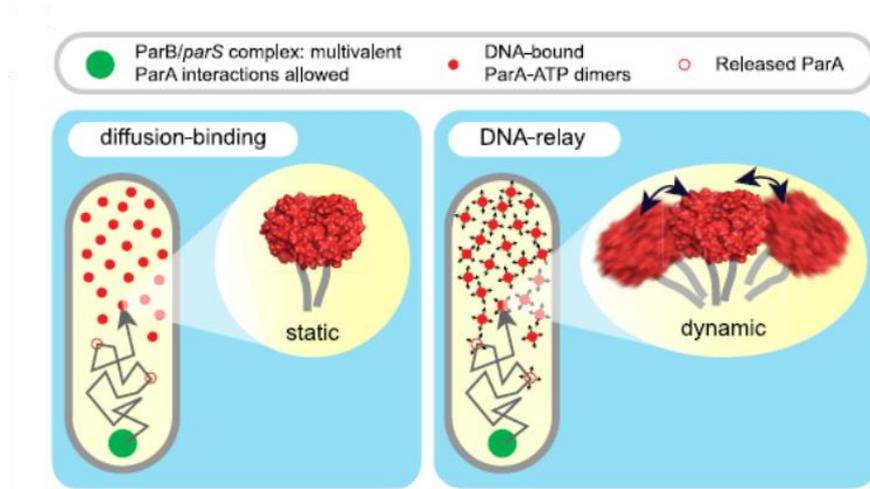


Figure 29: Le modèle du DNA-relay.

Schéma représentant le « diffusion binding » (à gauche) et le « DNA-relay » à droite.

Dans les deux cas, ParB lié au *parS* (en vert) interagit avec ParA-ATP (rond rouge), stimule d'hydrolyse de l'activité ATPase de ParA ce qui résulte en la dissociation de ParA (cercle rouge) de l'ADN (gris). La différence du DNA-relay est que ParA-ATP fluctue aléatoirement autour de sa position d'équilibre selon le mouvement de l'ADN auquel ParA-ATP est associée alors que l'ADN est immobile dans le modèle du « diffusion-binding ».

(Lim et al., 2014)

Il se formerait alors un gradient de ParA dans la cellule, qui serait responsable de la migration et donc de la séparation des origines répliquées. Le déplacement de la région du chromosome contenant le complexe ParB/*parS*, vers une région contenant plus de ParA-ATP (Hwang et al., 2013; Vecchiarelli et al., 2010) serait en effet favorisé par ce gradient (**Figure 28**).

Une étude de modélisation (mathématiques) réalisée chez *C. crescentus*, a cependant suggéré que le gradient de ParA-ATP ne peut pas suffire à diriger la ségrégation des chromosomes bactériens (Lim et al., 2014). Dans cette étude, il a d'abord été montré via des chromatographies d'exclusion de taille que ParA formerait des dimères en présence d'ATP, et que cette protéine ne s'associerait pas en oligomères (donc qu'il n'y aurait pas formation de filaments de ParA). Le suivi d'une version fluorescente de ParB (GFP) dans la cellule toutes les 20 secondes montre un déplacement de ParB en 3 phases : une première phase lente indépendante de l'ATP pendant laquelle les deux origines sont séparées (bulk segregation mechanism), une deuxième phase plus rapide, dépendante de l'ATP, et une dernière phase d'ancrage du complexe de partition au nouveau pôle via une interaction physique entre ParB et PopZ (protéine impliquée dans l'ancrage du chromosome cf plus loin)(Lim et al., 2014). Par ailleurs la localisation de ParA via de la microscopie à haute résolution (PALM pour Photo-activated localization microscopy) montre que ParA est diffus sur l'axe transversal de la cellule. Ces résultats favorisent un modèle de type « diffusion-ratchet » qui comme déjà indiqué précédemment, impliquerait un gradient de ParA pour le déplacement du complexe de partition. Ce modèle a été simulé bio-informatiquement en utilisant des paramètres reflétant au maximum les conditions *in vivo*. 1000 trajectoires dans des cellules virtuelles ont été générées pour la phase rapide de déplacement de ParB dépendante de l'ATP soit pour 1 μ m de distance de translocation parcouru environ. Les résultats des simulations indiquent qu'en moyenne la trajectoire ne montre que peu ou pas de translocation et aucune des trajectoires n'a pu traverser les 1 μ m de distance dans le temps correspondant au temps de translocation *in vivo* (Lim et al., 2014).

Dans la même étude, toujours chez *C. crescentus*, il est proposé une variation du modèle de « diffusion-ratchet » dans laquelle l'élasticité et le mouvement dynamique de l'ADN aide ou dirige la translocation du chromosome sur de courtes distances. C'est le modèle du « DNA-relay » (Lim et al., 2014) (**Figure 29**). Le suivi d'un locus du chromosome en time-lapse montre que sa localisation est dynamique, qu'il bouge autour de son point d'équilibre au cours du temps (le suivi a été réalisé avant la réplication et la ségrégation du locus). Cela implique une élasticité de l'ADN. Les trajectoires obtenues pour des cellules virtuelles après ajout du paramètre d'élasticité du chromosome, dans la simulation de modèle de « diffusion-ratchet » montrent une translocation rapide du complexe de partition (Lim et al., 2014). Dans ce nouveau modèle proposé du « DNA-relay », les dimères de ParA-ATP liés à un locus d'ADN fluctuent autour du point d'équilibre de ce locus. Lorsque le système de partition s'attache à un dimère de ParA-ATP qui est étiré par rapport au point d'équilibre, cela entraîne une force élastique qui déplace le complexe vers le point d'équilibre du locus sur lequel est fixé ParA jusqu'à ce que l'hydrolyse de l'ATP le détache.

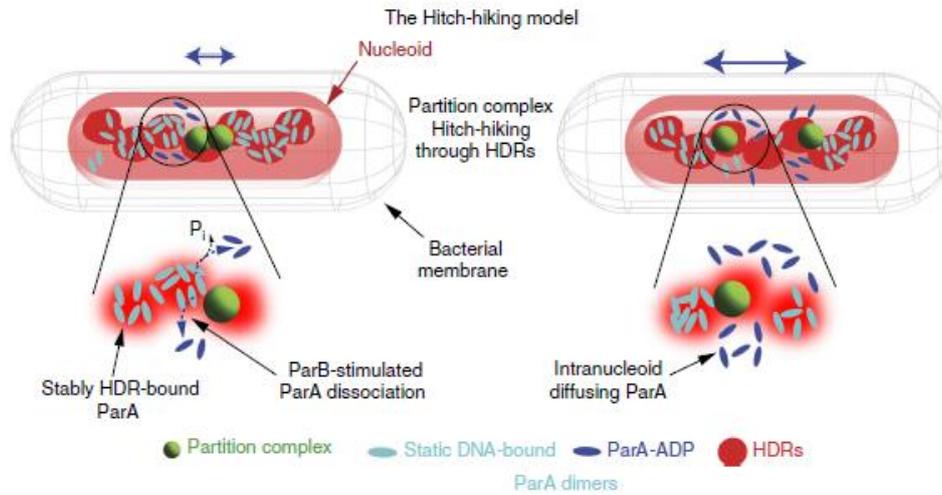


Figure 30: le modèle du Hitch-hiking

ParA-ATP est localisée en petit patches dans des régions de forte densité d'ADN (HDR en rouge). ParB lié au *parS* (en vert) stimule l'activité ATPase de ParA (en bleu clair) qui se dissocie alors de l'ADN (ParA-ADP en bleu foncé). ParA-ADP diffuse alors le temps de refixer l'ATP et peut alors à nouveau se fixer à l'ADN, le délais de fixation de l'ATP favorise sa refixation à l'ADN dans une HDR différente. La diminution de la concentration de ParA-ATP favorise le mouvement du complexe ParB-*parS* vers les HDR plus concentrées et les deux copies du chromosome sont ainsi ségrégées.

(Le Gall et al., 2016)

La répétition de ce processus a pour résultat un relais du complexe de partition d'une région chromosomique à l'autre dont la direction est donnée par le gradient de ParA-ATP (Lim et al., 2014).

Un autre dérivé du modèle de « diffusion-ratchet » appelé « hitch-hiking » a été proposé pour *B.subtilis* (et pour le plasmide F de *E.coli* dans la même étude). Dans cette étude, une combinaison d'un marquage à haute densité de tout le chromosome avec de la microscopie à illumination structurée (3D-SIM) a tout d'abord permis de détecter en 3D la localisation du complexe de partition dans le volume du nucléoïde. Il a été observé pour la première fois que les complexes de partition sont confinés à l'intérieur du nucléoïde et particulièrement au centre de l'axe longitudinal, et ceux, pour les systèmes plasmidiques et chromosomiques (Le Gall et al., 2016). La localisation de ParA a aussi été suivie par 3D-SIM et il a été observé que cette protéine est localisée en gradient avec une concentration plus élevée à un des pôles de la cellule. Les projections latérales et axiales du volume 3D de ParA montrent des patchs de ParA distribués le long du gradient de ParA. Des études de mutants ont montré que la localisation volumétrique des complexes de partition nécessite que ParA se fixe de façon non spécifique sur l'ADN et que ParB stimule l'activité ATPase de ParA (Le Gall et al., 2016). Des régions de forte densité d'ADN ou HDRs ont été identifiées précédemment grâce à de la microscopie en super-résolution (Marbouty et al., 2015). Des analyses en 3D-SIM ont montré que ParB et les HDR ont un degré de colocalisation de 20%, ce qui indique que les complexes de partition doivent interagir avec ces HDRs. ParA et les HDRs sont eux très souvent colocalisés avec 82 + ou - 24% de colocalisation. Par ailleurs, la localisation d'une molécule unique de ParA a été suivie par single-particle tracking PALM (spt-PALM)(Le Gall et al., 2016; Marbouty et al., 2015). Les résultats indiquent qu'il y a deux types de trajectoires de ParA : Une très mobile qui explore une large partie du nucléoïde et une plus statique localisée au niveau des patchs. Le nombre de patchs statiques corrèle avec le nombre de patchs colocalisés avec les HDRs observés en 3D-SIM. Cette localisation aux HDRs est importante pour la localisation des complexes de partition et pour une ségrégation correcte des chromosomes et elle est maintenue au cours du cycle cellulaire (Le Gall et al., 2016).

A partir de ces données le modèle de « hitch-hiking » a été proposé. Dans ce modèle ParA-ATP s'assemble en patchs dans des régions ayant une haute densité d'ADN (ou HDR). Comme évoqué précédemment, ParA peut se dissocier de l'ADN par hydrolyse de l'ATP de façon dépendante ou indépendante de ParB (qui favorise en effet son activité ATPase et donc sa dissociation de l'ADN). L'interaction de ParB avec les patchs de ParA dans les HDR, entraînerait donc la dissociation de ces patchs. ParA-ADP (non fixés à ParB) diffuse dans la cellule avant de pouvoir refixer l'ATP et donc de pouvoir à nouveau se fixer à l'ADN de façon non spécifique dans d'autres HDR. Après dissociation de ParA-ATP d'une HDR, les complexes ParB-*parS* diffusent vers l'HDR riche en patch ParA la plus proche et ainsi se ferait la ségrégation des copies du chromosome (Le Gall et al., 2016) (Figure 30).

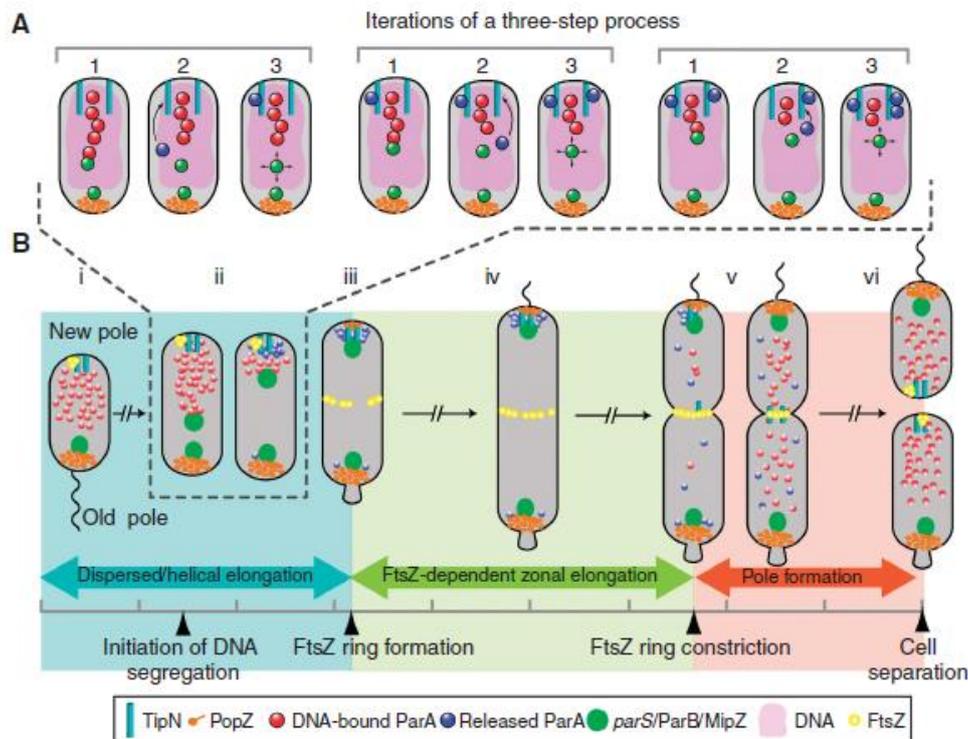


Figure 31: ancrage du chromosome de *C. crescentus*

(A) Modèle de ségrégation via ParB-*parS*. Après initiation de la réplication, un des complexes ParB-*parS* (en vert) va au contact de l'extrémité de la structure formée par ParA-ATP (cercle rouge) pour laquelle parB a une forte affinité de fixation. ParB stimule l'activité ATPase de ParA et donc la dissociation de ParA de l'ADN (cercle bleu). Cela réduit la taille de la structure de ParA et les molécules de ParA dissociées sont séquestrées par TipN (traits turquoise) au nouveau pôle de la cellule pour empêcher la formation d'une nouvelle structure de ParA-ATP associée à l'ADN. ParB-*parS* se déplace alors (mouvement Brownien) vers la nouvelle extrémité de la structure de ParA se rapprochant ainsi du nouveau pôle. L'enchaînement de plusieurs cycles comme celui-ci permet la translocation de ParB-*parS* jusqu'au nouveau pôle.

(B) Modèle pour la coordination du cycle cellulaire. (i) Avant l'initiation de la réplication et de la ségrégation, *parS*/ParB/MipZ (vert) sont tous attachés au vieux pôle de la cellule via un réseau de PopZ (orange) favorisant la formation d'une structure de ParA-ATP liée à l'ADN avec un biais vers le nouveau pôle. (ii) pendant la ségrégation des complexes de partition, la condensation de la structure de ParA-ATP par TipN assure la translocation rapide et unidirectionnelle du complexe de partition. TipN et PopZ maintiennent les complexes de partition au nouveau pôle (iii) l'anneau de FtsZ, nécessaire à la division cellulaire se forme (iv) de telle façon qu'il y a un seul cycle de ségrégation des chromosomes par cycle cellulaire. (v) Peu de temps avant la fin du cycle cellulaire TipN est délocalisé du nouveau pôle, ce qui contribue au relâchement de ParA. (vi) L'étape précédente couplée à la cytokinèse qui crée de nouveaux pôles sans ParB ni PopZ, re-initie le cycle et permet de rétablir une structure de ParA-ATP lié à l'ADN dans les cellules filles.

(Schofield et al., 2010)

Selon les bactéries le système ParABS est plus ou moins important : il est essentiel chez *C. crescentus* alors que son absence ne pose pas de gros problèmes pour la ségrégation chez *B. subtilis* (Ireton et al., 1994; Mohl et al., 2001). Par ailleurs, il y a des bactéries qui ne possèdent que ParB et *parS* et pas ParA, comme c'est les cas des *Streptococcus* ou des *Staphylococcus* (Livny et al., 2007). Ces observations montrent qu'il y a aussi des variations de composition et de fonctionnement du système.

2.1.1.2. Un ancrage au pôle du chromosome pour certaines bactéries

Chez certaines bactéries, après migration d'une ou deux copies de l'origine via ParABS, il y a un ancrage de la région de l'origine de réplication au pôle de la cellule.

Chez *C. crescentus*, cet ancrage joue un rôle primordial dans la régulation spatio-temporelle de la division cellulaire. Deux protéines jouent un rôle important pour cet ancrage et donc l'organisation du chromosome. Avant la réplication du chromosome orienté longitudinalement, ParB liée au site *parS* au niveau d'*oriC* est ancrée au vieux pôle par la protéine PopZ (Ptacin et al., 2010). La protéine TipN, localisée alors au nouveau pôle aiderait à la régénération du gradient de ParA-ATP (Lam et al., 2006; Schofield et al., 2010). Ensuite de façon concomitante à la réplication, l'une des copies répliquées est déplacée vers le nouveau pôle de la cellule via ce gradient de ParA (cf modèle ségrégation précédemment). Lorsque l'une des copies de l'origine arrive au nouveau pôle, ParB/*parS* et ParA sont maintenus par TipN et PopZ de telle façon qu'il y a un seul cycle de ségrégation par cycle cellulaire. A la fin du cycle cellulaire, TipN est délocalisé du nouveau pôle, ce qui entraîne aussi la délocalisation de ParA. Suite à la cytokinèse un pôle sans PopZ ni ParB est créé dans chaque cellule fille. TipN se localise à ces nouveaux pôles dans les cellules filles et un nouveau cycle commence (**Figure 31**) (Schofield et al., 2010).

Chez *V. cholerae*, le chromosome 1 est ancré au pôle de la cellule via une protéine transmembranaire, HubP conservée dans les autres espèces *Vibrio*. Le mécanisme exact d'ancrage n'est pas très clair. Cependant le modèle privilégié est que ParA1 soit un lien entre ParB1 lié à *parS1* et HubP (Yamaichi et al., 2012). HubP interagit aussi avec FlhG qui module la formation des flagelles et indirectement avec ParC qui régule la localisation de l'appareil chimiotactique (**Figure 32**). ParA1 serait localisé au nouveau pôle au début de la ségrégation et permettrait la ségrégation puis l'ancrage d'un complexe ParB lié au *parS*. HubP a des similarités fonctionnelles avec PopZ et TipN, comme le fait qu'il marque le nouveau pôle rapidement. Il y a cependant aussi des différences, notamment la localisation cellulaire. HubP est en effet présent aux deux pôles et non uniquement au nouveau pôle comme TipN ou seulement au vieux pôle au début du cycle comme PopZ (Yamaichi et al., 2012).

Un système d'ancrage au pôle a aussi été identifié chez *Corynebacterium glutamicum* et semble être conservé chez les Actinobactéries (Donovan et al., 2012). Il implique une protéine DivIVA qui interagit directement avec ParB.

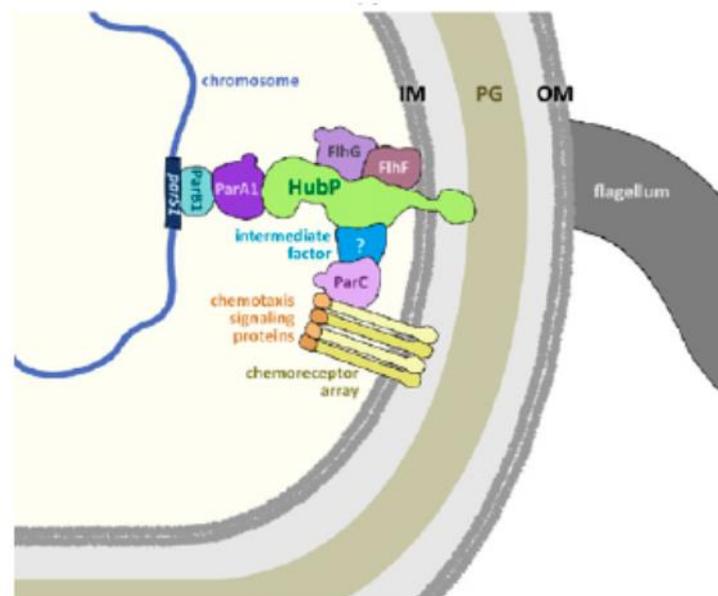


Figure 32: ancrage au pôle de *V. cholerae*

Différentes régions de HubP ancrent 3 ATPase de type ParA (ParA1, ParC et FlhG) au vieux pôle de la cellule. Ces ATPases servent d'intermédiaire pour la localisation polaire du complexe ParB1/*parS1*, des récepteurs chimiotactiques et les protéines du signal chimiotactique et module la formation du flagelle (FlhG et FlhF sur le schéma) respectivement. L'ancrage de ParC par HubP serait indirect. (Yamaichi et al., 2012)

Après répllication l'une des origines migre vers le pôle de façon dépendante de ParA jusqu'au pôle opposé où elle sera ancré via DivIVA et ParB. Au moment de la division, DivIVA est localisé au site de cytokinèse et sera ainsi localisé aux nouveaux pôles des cellules filles pour le cycle suivant (Donovan et al., 2012)(Figure 33). Chez *Myxococcus xanthus*, dont le chromosome est orienté longitudinalement, ParB lié au *parS* est localisée dans la région subpolaire et non au pôle de la cellule, laissant imaginer un ancrage du chromosome dans cette région via ParA. Les éléments impliqués dans cet ancrage ne sont pas connus jusqu'à présent, aucune protéine homologue à celles identifiées chez d'autres bactéries n'ayant été trouvées (Harms et al., 2013; Iniesta, 2014). De même chez *P. aeruginosa* aucun ancrage n'a été trouvé.

2.1.2. Ségrégation des origines de répllication chez les bactéries sans système de partition

Plusieurs possibilités ont été évoquées pour expliquer la ségrégation des origines de répllication chez les bactéries ne possédant pas de système ParABS. Une étude par des expériences de FISH chez *E. coli* a proposé que cette ségrégation des origines sans système de partition soit due à la séparation brutale des deux copies du chromosome après répllication (Bates and Kleckner, 2005). Une fois répliquées, les deux copies d'un loci resteraient co-localisées en moyenne 7-10 minutes avant de se séparer brutalement. Il a également été observé, chez la même bactérie, via l'utilisation d'étiquettes fluorescentes (FROS), que pour deux régions de 100-150kb, *snaps1* et *snaps2*, situées dans le premier tiers du bras droit du chromosome (en partant d'*oriC*), le temps de co-localisation est plus long (20-30 minutes)(Joshi et al., 2011) (Figure 34). Les copies des loci situés en dehors de ces *snaps* ne sont déjà plus co-localisées, mais restent proches jusqu'à ce que les *snaps* se séparent à leurs tours. Les mécanismes moléculaires du maintien prolongé de la co-localisation des *snaps1* et *snaps2* restent à déterminer (des appariements ADN-ADN ou une pression intranucléoides sont deux possibilités évoquées) (Bates and Kleckner, 2005; Joshi et al., 2011).

La séparation abrupte des chromosomes pourrait s'expliquer par l'accumulation d'ADN dans l'espace confiné du nucléoïde qui pourrait générer des forces internes, ce qui pousseraient les deux copies de chromosomes à se séparer (Bates and Kleckner, 2005). Plus précisément, les origines se sépareraient d'abord (à cause des forces internes), ce qui favoriserait la séparation des copies des autres loci répliqués. Les *snaps* empêcheraient ces forces de séparer entièrement les deux copies du chromosome jusqu'à ce qu'elles deviennent trop fortes et que ces *snaps* se séparent à leurs tours brusquement, entraînant l'éloignement des deux copies dans la cellule (Joshi et al., 2011; Kleckner et al., 2014).

E. coli ne possède pas d'homologues de ParA et de ParB, mais un analogue hypothétique de *parS* a été identifié. il s'agit de la séquence *migS*, localisée proche de l'origine de répllication (Yamaichi and Niki, 2004). La séquence de *migS* montre une symétrie typique de séquences cibles des protéines se fixant sur l'ADN. Cette séquence a aussi été retrouvée chez deux espèces différentes de *Shigella flexneri* (qui n'ont pas non plus d'homologues de ParABS).

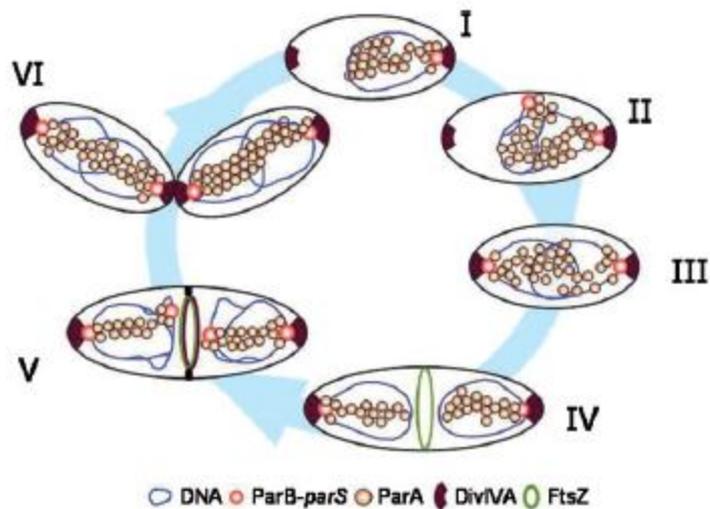


Figure 33: Modèle de l'ancrage du chromosome de *C. glutamicum*

(Donovan et al., 2012)

(I) Avant l'initiation de la réplication, l'origine de réplication est localisée à l'un des pôles de la cellule (ADN en bleu).

(II) Après initiation de la réplication, le complexe ParB-*parS*-*oriC* (ParB/*parS* en orange) migre vers le pôle opposé.

(III) Lorsque l'origine atteint le pôle opposé ParB interagit avec DivIVA (en bordeaux) ce qui permet d'ancrer le chromosome au pôle de la cellule.

(IV) Une fois les chromosomes ségrégés, FtsZ polymérise dans l'espace inter-nucléaire pour former l'anneau de FtsZ nécessaire à la division cellulaire.

(V) En condition de croissance rapide, plusieurs cycles de réplication peuvent être initiés avant la division cellulaire. Dans ce cas, les origines sont ségrégées au niveau du site de division. DivIVA est recruté tardivement au niveau du septum de division. Les origines ségrégées sont alors maintenues au niveau du septum via l'interaction entre ParB/*parS* et DivIVA.

(VI) Le septum de division est construit et DivIVA est divisé entre les deux nouveaux pôles ancrant les origines nouvellement répliquées aux nouveaux pôles.

Cependant bien qu'impliquée dans la ségrégation, la délétion de cette séquence n'a qu'un faible impact sur cette ségrégation, indiquant qu'il y a des mécanismes redondants (Fekete and Chattoraj, 2004).

2.2. Ségrégation de l'ensemble du chromosome

La ségrégation des origines de réplication via le système ParABS pourrait entraîner le reste du chromosome de chaque côté de la cellule. Les deux copies du chromosome seraient ainsi ségréguées de façon concomitante à la réplication. D'autant plus que, comme indiqué dans la partie précédente, chez certaines bactéries les origines s'ancrent au pôle de la cellule après ségrégation, ce qui pourrait aussi aider à maintenir le positionnement des chromosomes après ségrégation.

Selon plusieurs études, la ségrégation de l'ensemble du chromosome se ferait uniquement par des forces physiques (Jun and Mulder, 2006) comme c'est évoqué pour les origines des chromosomes dépourvu de système ParABS. Cependant il a aussi été montré que d'autres facteurs facilitent cette ségrégation. De façon générale tous les éléments participant à l'organisation du chromosome aident à sa ségrégation. C'est notamment le cas des protéines interagissant avec l'ADN comme les NAP et notamment HU et IHF qui, en compactant l'ADN au fur et à mesure de la réplication, aiderait à séparer les deux copies du chromosome (Hong and McAdams, 2011; Swiercz et al., 2013). Des mutants de HU et IHF présentent des défauts de ségrégation, ce qui confirme leur rôle dans ce phénomène (Huisman et al., 1989; Swiercz et al., 2013). Des mutants du surenroulement négatif ont aussi des défauts de ségrégation (cellules anucléées), notamment des mutants de la topoisomérase IV. Cette dernière décatène l'ADN après la fourche de réplication. Elle crée une cassure double brin par laquelle, un autre segment d'ADN peut passer puis elle referme la cassure (Wang et al., 2008; Zechiedrich et al., 1997).

Un autre acteur important de la ségrégation des chromosomes sont les condensines bactériennes. Chez *B. subtilis*, la délétion de SMC entraîne d'importants défauts de ségrégation. (Sullivan et al., 2009).

Chez *E.coli*, un mutant MukBEF présente un pourcentage de cellules anucléées plus élevé que dans la souche sauvage et son absence entraîne également la perte de l'orientation left-ori-right (transversale). Des études récentes ont montré que MukBEF stimule la topoisomérase IV (Zawadzki et al., 2015). Le domaine « hinge » de MukB interagit physiquement avec la sous-unité qui permet la fixation de topo IV à l'ADN et son activité catalytique (Li et al., 2010). MukBEF en condensant l'ADN pourrait également faciliter la ségrégation comme le montre les expériences de HI-C réalisées au laboratoire (Lioy et al, en review) (cf partie condensines bactériennes)

Les condensines de type MksBEF notamment identifiées chez *P. aeruginosa* favorisent aussi la ségrégation des chromosomes. Son activité est pour le moment inconnue, même s'il a été suggéré que ça soit la même que MukBEF (Petrushenko et al., 2011).

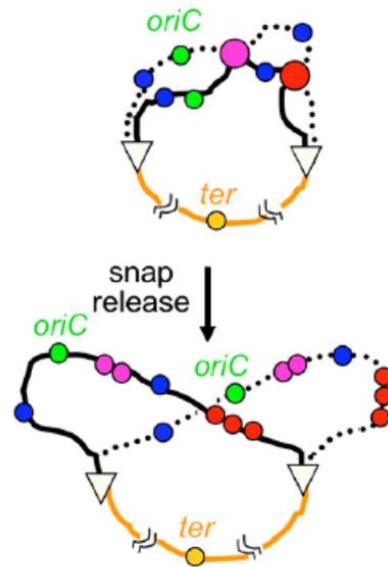


Figure 34: Modèle pour la ségrégation chez E.coli qui ne possède pas de système ParABS
(Joshi et al., 2011)

La perte coordonnée des liens au niveau des Snaps1 et Snaps2 (en rose et rouge) ont pour conséquence la séparation brutale des parties des chromosomes déjà répliquées (traits noir plein et pointillés). *oriC* est indiquée en vert, d'autres loci qui perdent leur cohésion avant les Snaps en bleu, l'ADN non répliqué est représenté en Jaune.

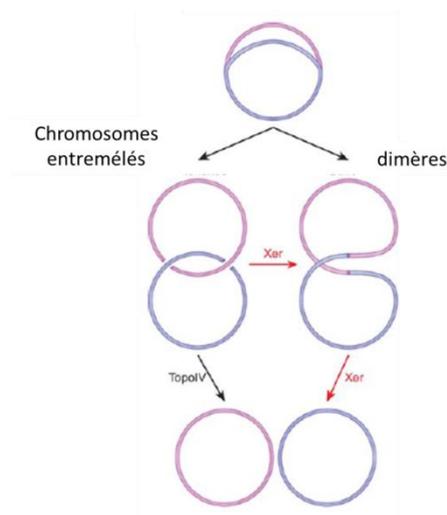


Figure 35: Problème possible en fin de ségrégation des chromosomes

Les chromosomes sœurs sont indiqués en rose et violet. TopoIV résout les chromosomes entremêlés (ou caténane). Xer résout les dimères de chromosomes (et les chromosomes entremêlés).(Midonet and Barre, 2014)

2.3. La terminaison de la ségrégation – division cellulaire

- **Terminaison de la ségrégation**

La terminaison de la ségrégation est concomitante à la formation du septum de division. Même si la ségrégation des origines de réplication entraîne l'ensemble du chromosome, la ségrégation des régions terminales requiert des machineries spéciales. En effet, en fin de ségrégation plusieurs problèmes peuvent être rencontrés du fait de la circularité du chromosome. Les deux copies répliquées peuvent rester entremêlées du fait des surenroulements générés par la réplication, ce qui a notamment été observé chez *E. coli* (Khodursky et al., 2000; Peter et al., 1998) (Figure 36). Par ailleurs, chez *E. coli*, dans 15% des cas, il se forme des chromosomes dimériques suite à des recombinaisons homologues (concaténas de chromosomes) (Steiner and Kuempel, 1998) (Figure 36). L'ADN translocase FtsK est nécessaire à la résolution de ces deux types de problèmes. Son domaine N-terminal permet d'ancrer la protéine au niveau du septum de division et est requis pour la division. Son domaine C-terminal forme le moteur de translocation de l'ADN. Le domaine C-terminal de FtsK reconnaît des séquences ADN de 8pb appelées KOPS (FtsK Orienting Polar Sequences) qui sont orientées et guident FtsK jusqu'au site *dif* où elle active la recombinase XerCD (Carnoy and Roten, 2009; Kono et al., 2011). Cette recombinase résout les dimères de chromosomes (Bigot et al., 2007; Lee et al., 2012)). Pour cela, XerC/D ouvre l'ADN au niveau du site *dif* (deletion induced filamentation). XerC et XerD sont en fait deux recombinases à tyrosines. La recombinaison est activée par une interaction entre FtsK et XerD qui active l'activité catalytique de XerD (Bigot et al., 2007). Des homologues XerC/D et le site *dif* sont retrouvés chez de nombreuses bactéries y compris *V. cholerae* et *P. aeruginosa*.

FtsK stimule également l'activité de la topoisomérase IV qui comme déjà évoqué précédemment « démêle » les chromosomes (Adams et al., 1992). Une étude récente, chez *E. coli* de la fixation de Topo IV sur le chromosome par des expériences de CHIP-seq a montré qu'elle se fixe à la fois spécifiquement et non spécifiquement à l'ADN (El Sayyed et al., 2016). Elle est chargée sur l'ADN pendant la réplication, dans la région de l'origine. Elle se fixerait spécifiquement à des sites qui pourraient servir de réservoirs. Elle est activée sur une douzaine de sites aléatoires afin de défaire le surenroulement de l'ADN due à la réplication. Si ces surenroulements ne sont pas résolus, les chromosomes restent entremêlés en fin de ségrégation ; ils seront également démêlés par la topoisomérase IV via son site de fixation au niveau de *dif*. Sa fixation au niveau de *dif* serait assurée par MatP (protéine impliquée dans l'organisation du macrodomaine Ter) et XerC (El Sayyed et al., 2016).

- **Division cellulaire**

Une fois la réplication et la ségrégation terminée, la division cellulaire peut avoir lieu. Elle se fait par fission binaire. Pour cela, il se forme d'abord un anneau de protéine FtsZ (FtsZ polymérise pour former un anneau) qui est un homologue de la tubuline, au futur site de division. Cet anneau servira de plateforme pour l'assemblage de la machinerie de division.

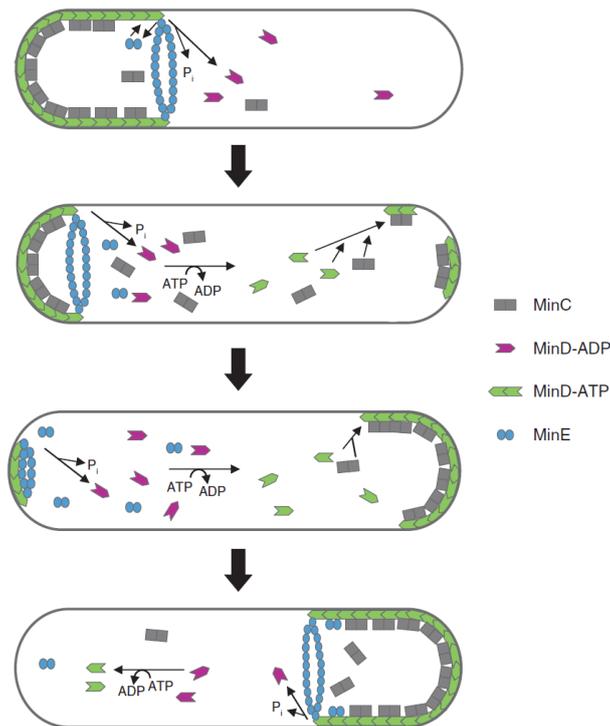


Figure 36: Schéma du fonctionnement du système MinCDE chez *E.coli*

MinD ATP se fixe sur la membrane et recrute MinC. MinE déplace MinC et stimule l'ATPase MinD détachant les protéines de la membrane. Si MinE peut immédiatement se refixer à d'autres MinD liées à la membrane, les protéines MinD doivent d'abord être régénérées en MinD-ATP. La concentration de MinD-ATP au voisinage du vieux pôle diminue car MinD-ATP se fixe de façon coopérative à la membrane sur laquelle d'autres MinD sont déjà fixées. Par contre la concentration de MinD-ATP augmente à l'autre pôle qui manque de MinD. Au fur et à mesure que la concentration s'élève, MinD-ATP se fixe finalement, formant une nouvelle zone polaire. MinE passe du vieux pôle à cette nouvelle zone polaire. Il y a ainsi une oscillation du système Min qui empêche la formation de l'anneau de FtsZ aux pôles de la cellule.

(Lutkenhaus, 2007)

Le site de division n'est pas choisi au hasard. Pour la plupart des bactéries étudiées ce site est localisé au milieu de la cellule ; ainsi deux cellules filles de taille identique sont obtenues après division.

Chez *B. subtilis* et *E. coli* deux types de système permettent la localisation centrale de l'anneau de FtsZ. Le système Min empêche l'assemblage donc la localisation de l'anneau au pôle de la cellule et des systèmes d'occlusion du nucléoïde (Nucleoid Occlusion System (NOC)) empêche la formation de l'anneau de FtsZ sur l'ADN.

Chez *B. subtilis*, le système Min est composé des protéines MinC, MinD et DivIVA. MinC interagit directement avec FtsZ et empêche sa polymérisation, donc la formation de l'anneau. L'ATPase MinD recrute MinC à la membrane. DivIVA localise les protéines Min au pôle de la cellule. Au moment de la division, l'affinité de MinC pour le pôle de la cellule diminue et MinC migre probablement avec MinD au milieu de la cellule. Ces protéines sont ainsi présentes aux nouveaux pôles des cellules filles après la division (Lutkenhaus, 2007).

Chez *E. coli*, le système est également composé de MinC et MinD. Au lieu de DivIVA une troisième protéine Min, MinE fait partie du système chez cette bactérie. Comme chez *B. subtilis*, MinD se fixe directement à la membrane et à MinC. MinE est indispensable pour la localisation de MinD et MinC au pôle de la cellule. MinE forme un anneau et entraîne le détachement de MinD d'un pôle et sa migration vers l'autre pôle. Ainsi MinD oscille d'un pôle à l'autre de façon dépendante de MinE. MinE lorsqu'il reconnaît MinD change de conformation, se fixe sur MinD, déplace MinC et stimule l'activité ATPase de MinD ce qui détache cette dernière protéine de la membrane. MinD, une fois l'ADP échangé pour l'ATP, pourra se refixer à la membrane. Sa fixation se fera plutôt sur un site éloigné du précédent car MinE qui l'a détaché peut rester sur la membrane et détacher d'autres complexes proches. Une fois les complexes MinCD désassemblés, MinE reprend sa conformation initiale et migre vers le pôle opposé (Gregory et al., 2008; Rowlett and Margolin, 2015) (Figure 36).

Les systèmes d'occlusion du nucléoïde protègent l'ADN de la formation de l'anneau. La première protéine d'occlusion du nucléoïde identifiée par des approches génétiques était Noc chez *B. subtilis*. En parallèle SlmA a été identifié chez *E. coli* dans un crible de mutants synthétiques létaux avec MinCDE (Bernhardt and de Boer, 2005; Wu and Errington, 2004). Des mutations de ces deux protéines rendent possible la formation du septum sur des chromosomes non ségrégués ce qui peut mener à la section des chromosomes. Ces deux protéines n'ont pas de séquence, ni structure en commun ; elles s'associent à l'ADN via des domaines de fixation différents, et les mécanismes par lesquels elles empêchent la formation de l'anneau de FtsZ seraient différents. Une interaction directe a été détectée entre FtsZ et SlmA *in vitro*. Des études de mutants *in vitro* et *in vivo*, ont montrées que SlmA agirait sous forme d'un dimère et empêcherait la formation d'un anneau de FtsZ en cassant les polymères de FtsZ (Cho et al., 2011; Tonthat et al., 2011).

Aucune interaction directe de la protéine Noc identifiée chez *B. subtilis* avec FtsZ n'a pu être identifiée, suggérant que Noc utiliserait un mécanisme différent. Il a été montré que Noc interagit avec la membrane cellulaire et avec l'ADN au niveau des Noc Binding Sequences (ou NBSs).

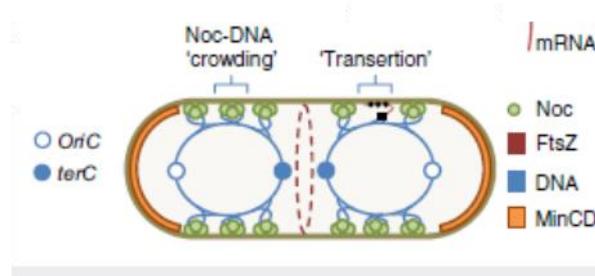


Figure 37: Modèle pour l'action de Noc (une des Nucleoid Occlusion Protein)

NOC (en vert) se dimérise et se fixe à l'ADN au niveau des sites de fixation spécifique (NBS pour NOC Binding Site). Noc forme des oligomères sur l'ADN non spécifique adjacent au site de fixation. NOC interagit avec la membrane entraînant l'ADN avec lui. La présence de MinCDE (en orange) au pôle de la cellule et de NOC/ADN au niveau de la membrane ne laisse libre que le centre de la cellule pour la formation de l'anneau de FtsZ.

(Adams et al., 2015)

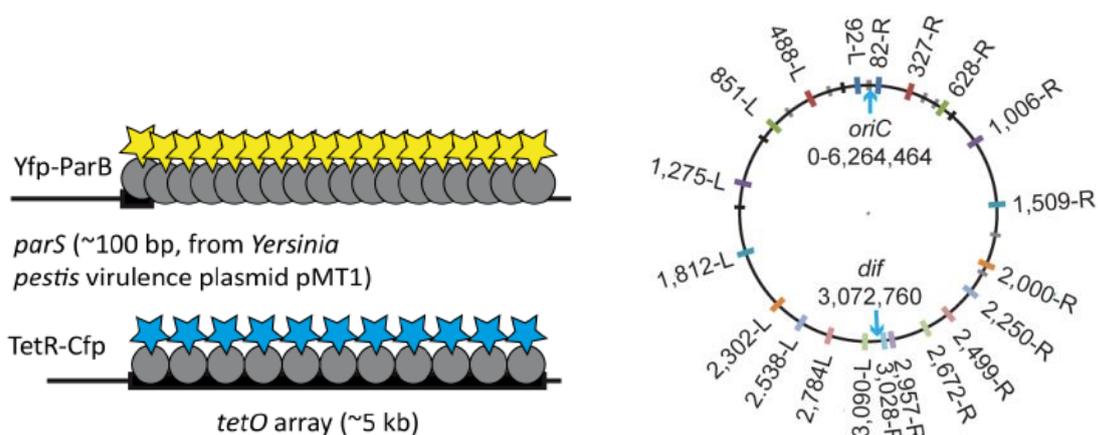


Figure 38 : FROS (Fluorescence Repressor-Operator System) ou suivi des localisations cellulaires par fluorescence et positions chromosomiques des étiquettes dont la localisation cellulaire a été étudiée.

Deux molécules fluorescentes ont été utilisées dans les expériences de microscopie. Dans les deux cas, la séquence spécifique d'une protéine (*tetO* ou *parS*^{pMT1} respectivement) est insérée au niveau du locus étudié. Les molécules fluorescentes YFP et CFP sont fusionnées respectivement aux protéines se fixant spécifiquement sur les sites insérés (YFP-ParB^{pMT1} se fixe sur *parS*^{pMT1} et TetR-CFP se fixe sur *tetO*). Les séquences des gènes codant pour les protéines fusionnées sont portées par un vecteur, introduit dans la souche contenant les séquences spécifiques, par transformation. Ainsi les protéines se fixent sur leurs séquences cibles et la localisation du locus d'intérêt se fait via celle de la fluorescence. En général la séquence *parS*^{pMT1} est insérée au niveau du Ter pour orienter le chromosome grâce à la fixation de YFP-ParB^{pMT1}. La séquence *tetO* est, elle insérée au niveau du locus à étudier. Les positions de loci qui ont été analysées dans notre cas sont 82-R, 628-R, 92-L et 488-L. Leurs numéros correspondent à leur distance par rapport à l'origine *oriC*. (Vallet-Gely and Boccard, 2013).

En interagissant avec la membrane, elle attirerait l'ADN à la périphérie de la cellule ce qui pourrait suffire à empêcher la formation de l'anneau de division (**Figure 37**).

L'ensemble de ces mécanismes de régulation négative pourrait déterminer le site de division. En effet, étant donné que MinCDE empêche la formation de l'anneau au pôle et que les Nucleoid Occlusion Factor empêchent la formation de l'anneau au niveau de l'ADN, seul le milieu de la cellule reste libre pour la formation de l'anneau de division. Des mécanismes de régulation positive ont aussi été identifiés chez certaines bactéries notamment chez *M. xanthus*, où un régulateur PomZ (Treuner-Lange et al., 2013) serait un régulateur de la formation de l'anneau de FtsZ en se localisant au centre de la cellule avant FtsZ.

En son absence, la formation de l'anneau de FtsZ est fortement réduite. Chez *S. coelicolor* SsgB recrute FtsZ au niveau du site de division. La localisation spatiotemporelle de SsgB est contrôlée par une autre protéine SsgA (Treuner-Lange et al., 2013; Willemse et al., 2011).

Une fois l'anneau de FtsZ formé au centre de la cellule, celui-ci se resserre (constriction de l'anneau) et l'enveloppe cellulaire s'invagine pour diviser les deux cellules.

3. *Pseudomonas aeruginosa*

3.1. Un pathogène opportuniste

Cette gamma-protéobactérie appartient au genre des *Pseudomonas*. Les membres de ce genre présentent une grande variabilité et sont capables de s'adapter à de nombreux types d'environnement terrestres ou aquatiques jusque dans les nuages. La bactérie ubiquitaire *P. aeruginosa* vivant dans les sols et dans les milieux humides, est un pathogène opportuniste pour les plantes, les animaux et l'Homme. Chez l'Homme, cette bactérie est inoffensive pour les individus sains, mais est responsable d'infections de nombreux tissus/organes chez les personnes immunodéprimées ou les grands brûlés. Ces infections peuvent être de deux types : des infections « aiguës » caractérisées par la sécrétion de nombreuses toxines, et les infections persistantes dans lesquelles elles forment des biofilms très résistants. Ce pathogène opportuniste est notamment une cause de mortalité chez les personnes atteintes de mucoviscidose (Silby et al., 2011). Ces infections sont particulièrement difficiles à traiter du fait de la grande résistance aux antibiotiques, intrinsèque à *P. aeruginosa*. Sa résistance aux antibiotiques est aussi due à la faible perméabilité de sa membrane et à la présence de nombreuses pompes à efflux.

Le génome de *P. aeruginosa* a été le 25^{ème} génome bactérien séquencé et la première souche de *P. aeruginosa* dont le génome a été séquencé est PAO1. Sa taille est de 6.3 MB et il contient 5570 ORF (Open Reading Frame) ou gènes prédits (Stover et al., 2000). Sa grande taille résulte d'une complexité génétique (il y a plus de gènes ayant une fonction unique) et pas de duplication de gènes comme ça peut être le cas chez d'autres espèces. Cette complexité génétique est sans doute ce qui lui permet (en partie) de s'adapter à différents environnements.

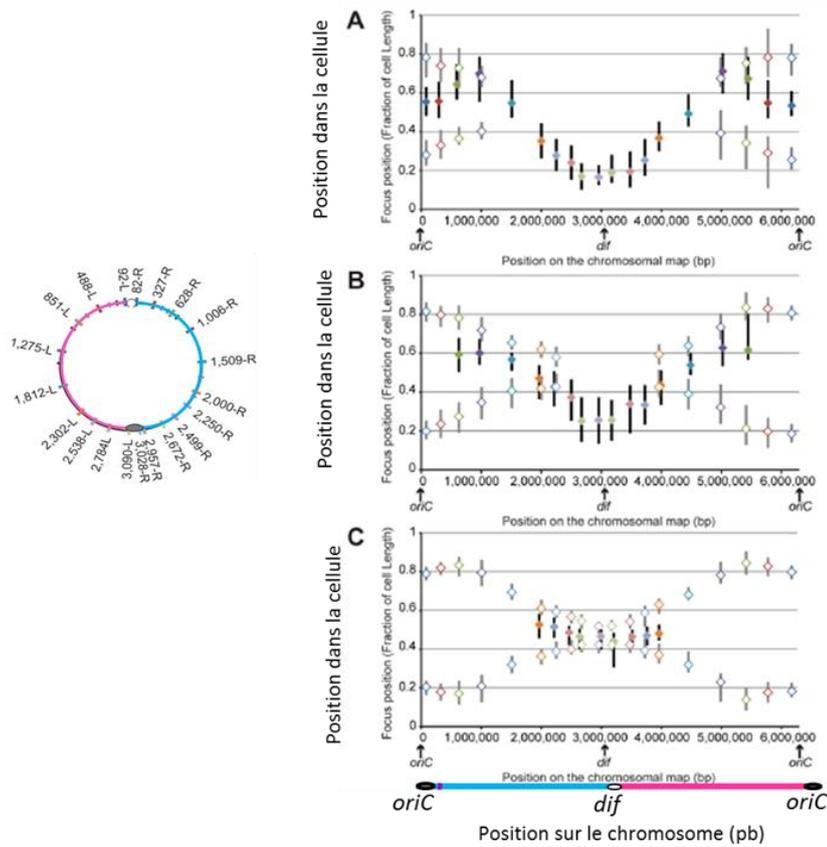


Figure 39: Positionnement du chromosome de la souche PAO1 sauvage dans la cellule.

Les cellules analysées sont classées en trois groupes : les petites cellules dont la taille est $< 2,8\mu\text{m}$ (A), les cellules de taille moyenne (entre $2,8$ et $3,5\mu\text{m}$) (B) et les grandes cellules dont la taille est $> 3,5\mu\text{m}$. La position de chaque étiquette (représentée sur le schéma du chromosome à gauche) est indiquée pour chaque classe de cellule en pourcentage de longueur de la cellule et orienté selon le nouveau pôle (0). Le 0 représente le nouveau pôle et le 1 l'autre pôle. Les losanges pleins et vides représentent la valeur médiane pour les cellules à 1 focus et 2 foci respectivement. Les barres noires (1 focus) et grises (2 foci) sont les 25/75 pourcentiles. (Vallet-Gely and Bocard, 2013)

Cela expliquerait aussi que la fonction de beaucoup de gènes reste pour le moment inconnue, car certains gènes ne sont sans doute pas utilisés dans les conditions de laboratoire. Approximativement 2503 gènes constitueraient le « core-génome » de *P. aeruginosa* (Mosquera-Rendón et al., 2016). La grande taille de son génome se rapproche de celle du génome de *Saccharomyces cerevisiae* (petit génome eucaryote) qui code pour environ 6200 protéines.

3.2. Organisation du chromosome et cycle cellulaire

P. aeruginosa possède comme la plupart des bactéries un unique chromosome circulaire qui, comme dit précédemment a une taille de 6.3 Mb. Afin d'étudier l'organisation du chromosome dans la cellule chez *P. aeruginosa*, un système d'étiquettes fluorescentes (FROS) a été développé au laboratoire (Vallet-Gely and Boccard, 2013). Ce système est basé sur la reconnaissance de séquences spécifiques par une protéine fluorescente. En plaçant ces séquences spécifiques à différentes positions sur le chromosome, on peut suivre la localisation cellulaire de ces positions. Des constructions ont été réalisées pour pouvoir insérer des étiquettes à 20 positions réparties sur tout le chromosome et cela pour deux couples de séquences spécifiques/protéines fluorescentes. Ces deux couples sont le site *parS* reconnu spécifiquement par YFP-ParB du plasmide pMT1 de virulence de *Yersinia pestis* (ce système *parS*/ParB n'interfère pas avec celui de *P. aeruginosa*) et les séquences *tetO* reconnues par TetR-CFP. Les deux protéines sont placées sous le contrôle d'un promoteur inductible à l'IPTG.

Les études de microscopie réalisées à l'aide de ce système ont montré deux régions spécifiques sur le chromosome (**Figure 39**). Tout d'abord, une région Ori qui s'étend sur environ 1.4 Mb. En effet, dans les grandes cellules c'est-à-dire celles dans lesquelles la plupart du chromosome est répliqué avant la division cellulaire, les deux copies des 3 étiquettes les plus proches d'*oriC* sur chaque bras du chromosome (82-R, 327-R, 628-R, 92-L, 488-L, 851-L) ont la même localisation cellulaire. Elles sont proches des 20 et 80% de la longueur de la cellule (une copie de chaque étiquette à 20 et une copie à 80%). La deuxième région observée ou région Ter, correspond à la région chromosomique autour de *dif*. Les 4 étiquettes les plus proches de ce site de recombinaison (2,672-R, 2,957-R, 3,090-L, 2,784-L) sont également localisées à la même position cellulaire. Dans plus de 75% des cellules, un seul focus est observé. Il est localisé au nouveau pôle de la cellule dans les cellules de petite et de moyenne taille et au milieu des cellules de grande taille.

Les autres loci chromosomiques sont localisés entre ces deux régions (entre 20 et 80% de la longueur de la cellule et le milieu de la cellule pour les cellules à 2 foci, et entre 20 et 70% pour les cellules à 1 focus). Ces observations indiquent que le chromosome serait orienté longitudinalement. Cette orientation a été confirmée par l'observation de la localisation de couples d'étiquettes fluorescentes situées à équidistance d'*oriC*.

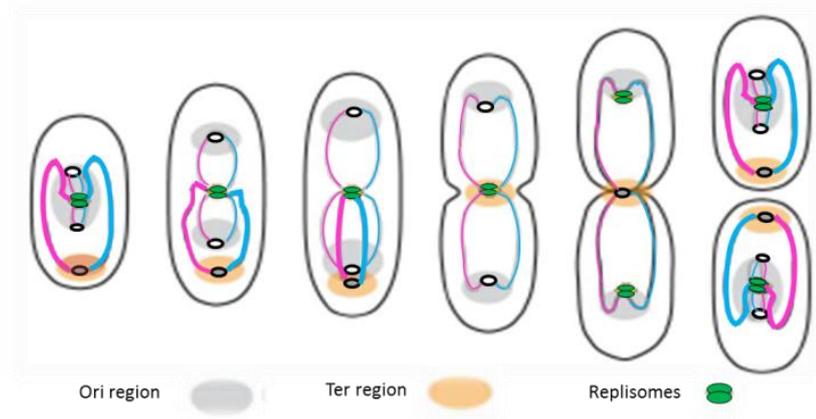
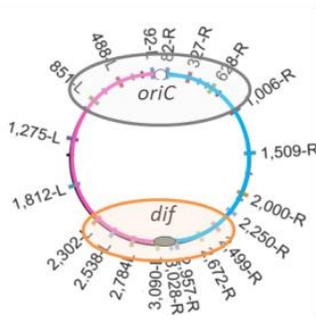


Figure 40: Cycle cellulaire de *Pseudomonas aeruginosa*

Cycle cellulaire pour des cellules de *P. aeruginosa* en milieu minimum supplémenté en glucose et casaminoacides. Les lignes épaisses représentent le chromosome avant répllication. Les lignes fines représentent l'ADN après répllication. Les réplisomes sont représentés en vert. Les domaines Ori et Ter sont en orange et gris respectivement.

(Vallet-Gely and Boccard, 2013)

En effet, deux étiquettes situées chacune sur un réplichore à égale distance d'*oriC* sont plus souvent co-localisées que deux étiquettes placées sur le même réplichore.

Plus récemment, la technique de 3C-seq mise au point au laboratoire a permis d'étudier la probabilité d'interaction d'un point du chromosome avec tous les autres points du chromosome. Les matrices de contacts montrent deux diagonales. D'une part, une diagonale principale indiquant des interactions entre les régions proches du chromosome. La deuxième diagonale montre des interactions entre les deux bras du chromosome, ce qui comme déjà indiqué précédemment pour d'autres bactéries (*B. subtilis* ou *C. crescentus*), corrèle avec une organisation longitudinale. De plus, on observe deux régions de plus fortes interactions sur la matrice, l'une autour d'*oriC* et l'autre dans la région terminus. La taille de ces régions corrèle avec les régions observées en microscopie. L'étude de la localisation des réplisomes par l'utilisation d'une fusion DnaX-GFP (l'une des protéines du réplisome) montre qu'ils sont le plus souvent situés au milieu de la cellule en un seul focus (90% des cellules). Ces résultats indiquent que chez *P. aeruginosa* les deux fourches de réplication sont majoritairement co-localisées au milieu de la cellule. Dans un petit nombre de cellules, 2 foci sont observés. Dans les petites cellules ces deux foci sont localisés au centre et sont assez proches. Dans les quelques grandes cellules, les deux copies sont localisées autour des 20 et 80 % de la longueur de la cellule, ce qui peut indiquer qu'un autre round de réplication commence dans ces cellules avant que la division ne soit terminée. Ces résultats indiquent que chez *P. aeruginosa* la réplication se fait au centre de la cellule et que le chromosome est relocalisé progressivement au milieu de la cellule pour être répliqué puis ségrégué (**Figure 40**) (Vallet-Gely and Bocard, 2013). Les mêmes résultats sont obtenus pour des études en milieux minimum supplémenté en citrate ou en glucose et casaminoacides.

3.3. Souche PAO1 du laboratoire

La souche de PAO1 utilisée au laboratoire comporte un système ParABS et un complexe condensine de type SMC comme c'est le cas pour les autres souches de *P. aeruginosa*. Par contre, elle a pour particularité d'avoir une délétion au niveau de MksBEF et ne possède donc pas de complexe condensine de ce type contrairement aux autres souches de l'espèce. Cette particularité en fait un très bon modèle pour étudier le fonctionnement du système ParABS et son lien avec le complexe SMC/ScpAB.

La mutation du système ParABS a un fort impact sur la ségrégation du chromosome, mais n'est pas létale, et des mutants Δ parA et Δ parB ont pu être étudiés. Ils ont un défaut de croissance lié à un défaut de ségrégation (20% de cellules anucléées) et à un mauvais positionnement du chromosome dans la cellule. L'absence de SMC a un impact plus modéré (Petrushenko et al., 2011), mais il reste à étudier plus en détails.

3.4. Problématiques de la thèse

Dans le cadre de mon projet de thèse, je me suis plus particulièrement intéressée, d'une part au fonctionnement du système ParABS, notamment à la fixation de ParB sur le chromosome, et d'autre part au complexe SMC et à son lien avec ParABS.

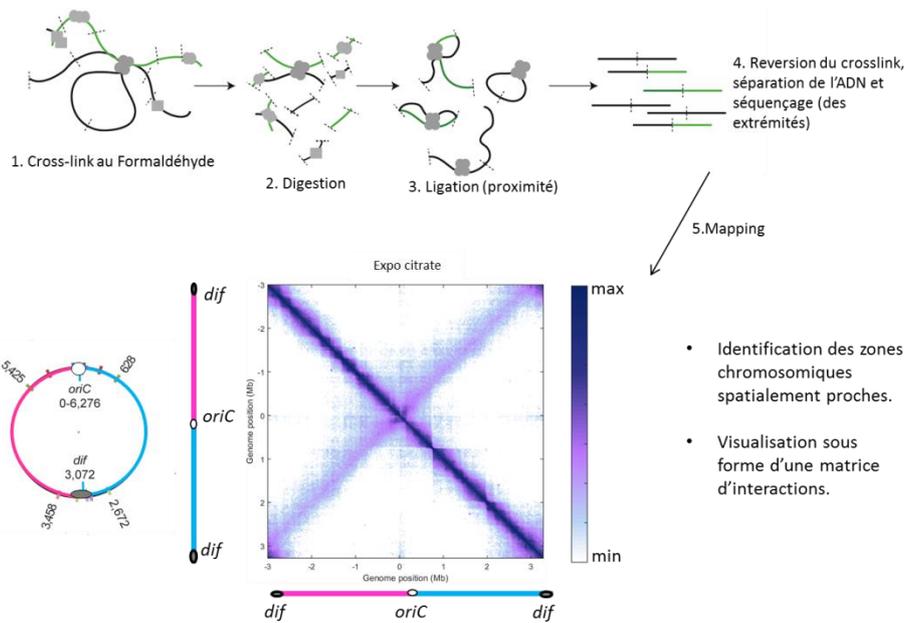


Figure 41 : Représentation des étapes du 3C-seq et matrice WT *Pseudomonas aeruginosa*

Le 3C-seq consiste en une étape de crosslink (ou fixation covalente) des protéines et de l'ADN (1) puis l'ADN est digéré par une enzyme de restriction (2). Ensuite, après une étape de ligation (3) le crosslink est reversé (4), puis l'ADN est séquéncé. Le résultat est présenté sous forme d'une matrice de contact (5) qui est ici représentée pour une souche WT de *P. aeruginosa*. Sur cette matrice sont indiquées toutes les interactions de chaque point du génome avec tous les autres points du génome. Les bras du chromosome (aussi représenté en cercle à côté de la matrice) sont indiqués en bleu (bras droit) et rose (bras gauche) pour la matrice réalisée à partir d'une culture de cellules en milieu minimum citrate. Un résultat similaire est obtenu en partant d'une culture de cellules en milieu minimum supplémenté en glucose et casaminoacides (cf figure 43 de la partie résultats).

Je me suis d'abord concentrée sur l'importance des sites *parS* et du positionnement de ces sites sur le chromosome pour le fonctionnement du système ParABS. En effet, ces séquences sont souvent retrouvées proche de l'origine de réplication, ce qui pourrait indiquer une importance de cette localisation. J'ai donc étudié l'impact du changement de la position chromosomique de ces séquences pour la ségrégation et la conformation du chromosome. Je me suis ensuite intéressée au lien de ce système de partition avec le complexe SMC/ScpAB, ce complexe ayant lui aussi un rôle dans l'organisation et la ségrégation des chromosomes chez *P. aeruginosa*.

RESULTATS

1. Article "Regional Control of Chromosome Segregation in *Pseudomonas aeruginosa*"**1. Article "Regional Control of Chromosome Segregation in *Pseudomonas aeruginosa*"****1.1. Résumé de l'article "Regional Control of Chromosome Segregation in *Pseudomonas aeruginosa*"**

Les séquences ADN *parS* qui sont très conservées sont en nombre variable selon les espèces. Par contre leur localisation est très souvent la même : elles sont proches de l'origine de réplication.

Dans cette étude, je me suis intéressée aux séquences *parS* du système ParABS de la souche PAO1 de *P. aeruginosa*. Des expériences d'immuno-précipitation de la chromatine réalisées au laboratoire ont montré que ParB se fixe principalement sur 4 sites *parS* localisés proches d'*oriC*. Je me suis particulièrement concentrée sur ces 4 sites *parS* et j'ai tout d'abord montré, dans des conditions favorables pour la bactérie, qu'un seul de ces 4 sites peut suffire à une ségrégation correcte des chromosomes. Je me suis aussi intéressée à l'importance de la position chromosomique des sites *parS*. Pour cela, j'ai testé plusieurs positions chromosomiques pour *parS* et j'ai observé que certaines positions permettent une ségrégation correcte des chromosomes quand d'autres ne le permettent pas. Quelle que soit sa position, j'ai pu montrer que *parS* est reconnu par ParB même en dehors de la « zone de compétence », qu'il est localisé à 20 et 80% de la longueur de la cellule et qu'il est le site d'initiation de la ségrégation (il est le premier ségrégué avant *oriC*).

Pour définir précisément cet effet de position, j'ai utilisé une approche dérivée de la méthode du Tn-seq. J'ai en effet utilisé un transposon contenant un site *parS* (*tnparS*) pour générer une banque d'insertions aléatoires sur le chromosome dans une souche ayant les 4 sites *parS* sauvages inactivés ($\Delta parS1234$). Cette souche présente un important défaut de croissance provoqué par un défaut de ségrégation des chromosomes qui peut être sauvé par l'insertion d'un *tnparS*, si celui-ci est inséré à une position chromosomique permettant une ségrégation correcte des chromosomes. L'identification de ces sites d'insertion par séquençage a permis de délimiter une région de 650kb dans laquelle le site *parS* peut-être déplacé sans impact majeur pour la ségrégation des chromosomes. Cette région que l'on a appelée « zone de compétence » s'étend de -200 à +450 kb autour de l'origine de réplication. J'ai pu montrer que la présence d'un opéron ribosomique à -220kb serait la limite gauche de la « zone de compétence » et pourrait expliquer son asymétrie par rapport à la position de *parS* (proche d'*oriC* en WT).

En utilisant une approche génétique pour identifier les déterminants de cette « zone de compétence » j'ai mis en évidence un lien entre la compétence du site *parS* et la distance *oriC-parS*. En effet, le rapprochement d'une région contenant *oriC* d'un site *parS* en dehors de la zone de compétence rend ce site *parS* compétent.

1. Article "Regional Control of Chromosome Segregation in *Pseudomonas aeruginosa*"

1. Article "Regional Control of Chromosome Segregation in *Pseudomonas aeruginosa*"

D'une façon plus générale, cette étude a permis de mettre en évidence un lien fonctionnel entre *oriC* et *parS* chez *P. aeruginosa* qui suggère que le temps entre réplication et ségrégation des loci autour de l'origine de réplication est important. Un lien temporel entre ces deux processus a aussi été mis en évidence chez *B. subtilis*, où il a été observé que l'absence de ségrégation des origines de réplication par SMC est problématique pour la ségrégation des chromosomes.

Ce lien temporel entre réplication et ségrégation des origines de réplication pourrait expliquer que les sites *parS* soient très souvent localisés proche d'*oriC*.

1. Article "Regional Control of Chromosome Segregation in *Pseudomonas aeruginosa*"

1. Article "Regional Control of Chromosome Segregation in *Pseudomonas aeruginosa*"

1.2 Article "Regional Control of Chromosome Segregation in *Pseudomonas aeruginosa*"

RESEARCH ARTICLE

Regional Control of Chromosome Segregation in *Pseudomonas aeruginosa*

Valentine Lagage, Frédéric Boccard*, Isabelle Vallet-Gely*

Institute for Integrative Biology of the Cell (I2BC), CEA, CNRS, Univ. Paris-Sud, Université Paris-Saclay, Gif-sur-Yvette cedex, France

* isabelle.vallet-gely@i2bc.paris-saclay.fr (IVG); Frederic.BOCCARD@i2bc.paris-saclay.fr (FB)



CrossMark
click for updates

 OPEN ACCESS

Citation: Lagage V, Boccard F, Vallet-Gely I (2016) Regional Control of Chromosome Segregation in *Pseudomonas aeruginosa*. PLoS Genet 12(11): e1006428. doi:10.1371/journal.pgen.1006428

Editor: William F. Burkholder, A* STAR, SINGAPORE

Received: August 1, 2016

Accepted: October 15, 2016

Published: November 7, 2016

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

Data Availability Statement: ChIP-seq data are available from the Gene Expression Omnibus database via accession number GSE87409 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>). Tn-seq data are available from the SRA database (<https://trace.ncbi.nlm.nih.gov/Traces/sra/>) via accession number SRP090425.

Funding: Research in FB's laboratory is funded by CNRS and the Agence Nationale de la Recherche grant ANR-12-BSV8-0020-01. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Abstract

Chromosome segregation in bacteria occurs concomitantly with DNA replication, and the duplicated regions containing the replication origin *oriC* are generally the first to separate and migrate to their final specific location inside the cell. In numerous bacterial species, a three-component partition machinery called the ParABS system is crucial for chromosome segregation. This is the case in the gammaproteobacterium *Pseudomonas aeruginosa*, where impairing the ParABS system is very detrimental for growth, as it increases the generation time and leads to the formation of anucleate cells and to *oriC* mispositioning inside the cell. In this study, we investigate *in vivo* the ParABS system in *P. aeruginosa*. Using chromatin immuno-precipitation coupled with high throughput sequencing, we show that ParB binds to four *parS* sites located within 15 kb of *oriC* *in vivo*, and that this binding promotes the formation of a high order nucleoprotein complex. We show that one *parS* site is enough to prevent anucleate cell formation, therefore for correct chromosome segregation. By displacing the *parS* site from its native position on the chromosome, we demonstrate that *parS* is the first chromosomal locus to be separated upon DNA replication, which indicates that it is the site of force exertion of the segregation process. We identify a region of approximately 650 kb surrounding *oriC* in which the *parS* site must be positioned for chromosome segregation to proceed correctly, and we called it “competence zone” of the *parS* site. Mutant strains that have undergone specific genetic rearrangements allow us to propose that the distance between *oriC* and *parS* defines this “competence zone”. Implications for the control of chromosome segregation in *P. aeruginosa* are discussed.

Author Summary

Accurate transmission of the genetic information relies on replication and segregation, two processes essential to all living organisms. In bacteria, these processes occur concomitantly. Replication of the bacterial circular chromosome initiates at a single specific sequence called *oriC*, and proceed bi-directionally along the chromosome arms. A partition system called ParABS is involved in chromosome segregation in many bacteria. It involves the binding of the ParB protein to *parS* sequences, which are often found in the close vicinity of *oriC*. The importance of this system for chromosome segregation varies

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

according to species, ranging from essential to dispensable. In *Pseudomonas aeruginosa*, an important opportunistic pathogen, the ParABS system plays an important role in chromosome segregation, as mutants affected in this system present a severe growth defect as well as anucleate cells formation, but is not essential. In this study, we characterize the activity of the different determinants of the ParABS system in *P. aeruginosa* and demonstrate that it is critical for the *parS* site to be located close to *oriC*, which suggests that the timing of separation of regions close to *oriC* after replication is important, and that it could be a function of the ParABS system to keep this timing.

Introduction

Most bacteria possess a single chromosome, circular and replicated bi-directionally from a specific sequence called *oriC*. It must be highly compacted to fit inside the bacterial cell, which is typically one thousand times smaller than it is when extended. Despite recent advances, the mechanisms by which the two copies of the chromosome are segregated in daughter cells concomitantly with replication—allowing faithful transmission of genetic material—remains mostly a mystery. Diverse forces might be involved, including DNA replication [1], intranucleoid pushing forces resulting from radial confinement [2], or forces originating from polymer properties (that vary according to different models that consider the chromosome as either a self-avoiding [3] or a self-adherent polymer [4]).

In bacteria, two main molecular actors that are involved in chromosome segregation have been characterized: the structural maintenance of chromosome (SMC) complex and the ParABS system. SMC proteins are ubiquitous from eukaryotes to prokaryotes, and are only absent in a few bacterial species [5]. In contrast, the ParABS system is specific to bacteria, and was found in 70% of the sequenced species in 2007 [6]. It comprises three components. The ParB protein binds specifically to *parS* sites (sometimes compared to centromeric sequences) to form a nucleoprotein complex. ParA is a Walker A-type ATPase thought as the “motor” that provides the force for the segregation of the nucleoprotein complex [7]. Briefly, interaction of ParA-ATP dimer bound specifically to DNA with the ParB-*parS* nucleoprotein complex induces its ATPase activity and its release from DNA, which is thought to pull the ParB/*parS* complex via a diffusion-Ratchet mechanism [8]. This model was further elaborated by the recent proposition that the elasticity of chromosomal DNA could contribute to the directional transport of the ParB-*parS* nucleoprotein complex across a ParA-ATP gradient [9]. Moreover, two different models have been proposed regarding the molecular basis involved in the ParB-*parS* nucleoprotein complex formation, either by ParB from *Bacillus subtilis* (the “spreading and bridging” model, [10,11]) or by ParB from the F plasmid (the “nucleation and caging” model, [12]). Both models require the ability of ParB to also bind DNA non-specifically [13].

Although the *parS* sites exhibit an unusually high degree of sequence conservation and close proximity to *oriC* in the vast majority of bacteria, the copy number varies among species from 1 to more than 20 [6]. A functional link between the ParABS system and the SMC complex has been demonstrated in *B. subtilis* and *Streptococcus pneumoniae*, where the ParB-*parS* complex recruits SMC to the *oriC* region, thereby allowing correct chromosome segregation [14–16]. This recruitment is thought to depend on ParB ability to bridge DNA, a phenomenon previously described as “spreading” [10], but may also require a specific interaction of SMC with ParB [17,18].

The gamma-proteobacterium *Pseudomonas aeruginosa* is an ubiquitous opportunistic pathogen responsible for nosocomial infections and for the morbidity of Cystic Fibrosis patients.

The large size of its genome (6.3 Mb) results from genetic complexity rather than gene duplication, and allows this bacterium to colonize diverse niches [19,20]. It was previously shown that a ParABS system and an SMC complex participate in chromosome segregation in *P. aeruginosa* [21–26]. Ten *parS* sites scattered along the chromosome have been proposed, based on sequence homology and *in vitro* binding experiments [21,27]; however, another bioinformatics study predicted only 4 *parS* close to *oriC* in *P. aeruginosa* [6]. We previously showed that *P. aeruginosa* PAO1 chromosome is globally oriented from the old pole of the cell to the division plane/new pole along the *oriC-dif* axis, with the *oriC* region positioned around the 0.2/0.8 relative cell length in a ParA and ParB dependent manner [26].

To better understand the molecular function of the ParABS system in *P. aeruginosa*, we used here an *in vivo* approach to identify and characterize the activity of its different determinants. We show that ParB binds *in vivo* to 4 *parS* sites located close to *oriC*, and that one of these *parS* is sufficient for proper chromosome segregation. Using cells that carry only one *parS* site, and displacing this *parS* site from its native position, we show that *parS* is bound by ParB independently of its location on the chromosome, and positioned near the 0.2/0.8 relative cell length in a ParA dependent manner. It is the first chromosomal locus to be separated after replication, indicating that it is the site of force exertion of the segregation process. Moreover, we identify a region of approximately 650 kb surrounding *oriC* in which the *parS* site must be located for chromosome segregation to proceed correctly (as assessed by quantification of anucleate cell in growing cultures), suggesting a regional control of chromosome segregation in *P. aeruginosa*. We further provide evidence that efficient chromosome segregation requires proximity between *parS* and *oriC*, suggesting coordination between ParABS mediated chromosome segregation and the replication process.

Results

Identification of ParB binding sites *in vivo*

It was previously reported that the *P. aeruginosa* ParABS system plays a role in chromosome segregation [26,27]. However, there has been controversy about number of *parS* sites on the genome. To identify ParB binding sites *in vivo*, we replaced the chromosomal copy of the *parB* gene by a gene encoding a 3xFLAG tagged version of ParB (S1A Fig). The resulting strain behaves like the wild type strain (same generation time of 47 minutes and same amount of anucleate cells, less than 1%, S1B Fig). We then analyzed the positioning of two chromosomal loci inside growing cells using fluorescent microscopy. In minimal medium supplemented with citrate, chromosomal tags located near *oriC* and *dif* present the same localization pattern in the PAO1 ParB-3xFLAG strain and in the wild type PAO1 strain (S1C Fig), indicating that the ParB-3xFLAG is fully functional. We performed Chromatin Immunoprecipitation of ParB-3xFLAG followed by high throughput sequencing (ChIP-seq, see methods). Results presented in Fig 1A and S1 Table show that *in vivo*, ParB is mostly bound to four of the ten *parS* sites previously proposed (*parS1* and *parS4* (TGTTCCACGTGGAACC), and *parS2* and *parS3* (TGTTCCACGTGGAACA) from [21], which were also predicted as *parS* sites by [6]). Strong enrichment was found in more than 20 kb surrounding these 4 *parS* sites, which is consistent with the “spreading” phenomenon described for ParB binding to *parS* sites in other bacteria [10,12,13]. This suggests that these four *parS* sites are included in a large nucleoprotein complex formed by ParB. In contrast with previous *in vitro* results, ParB does not bind significantly *in vivo* to the other proposed *parS* sequences, which present two mismatches compared to the *parS1/parS2* sequences. We thus propose the TGTTCCACGTGGAACM sequence as *P. aeruginosa* *parS* site. This sequence is found in 4 occurrences in *P. aeruginosa* genome, and no additional occurrence is found when only one mismatch is allowed. It is interesting to note that

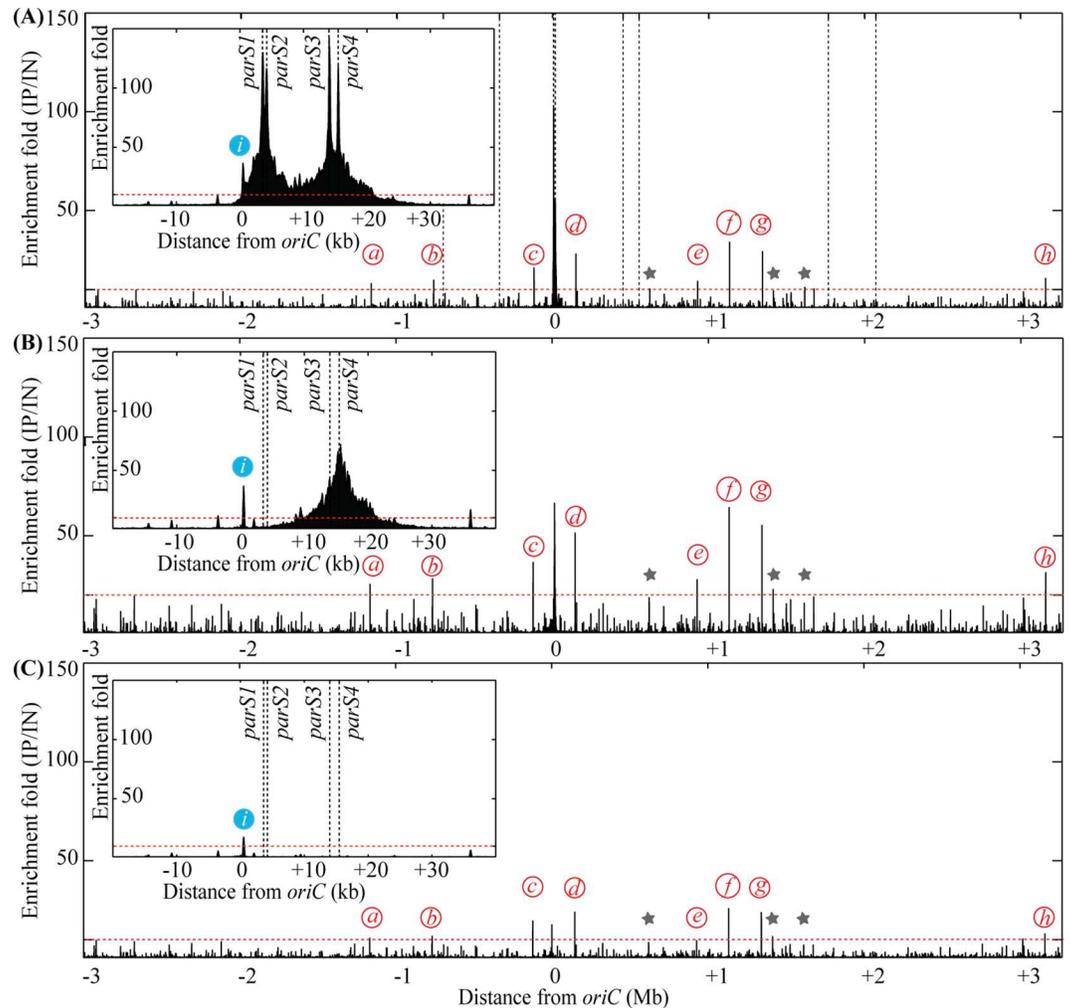


Fig 1. Chromatin Immunoprecipitation of ParB-3xFLAG, in the wild type background (strain IVGB379) (A), in the $\Delta parS123$ background (strain VLB3) (B) and in the $\Delta parS1234$ background (strain VLB4) (C). Enrichment folds between the immunoprecipitated (IP) and the input (IN) fractions are represented for each base of the genome, according to its distance from *oriC*. The insets represent a zoom of the region containing the four *parS* sites bound by ParB. Dashed vertical lines represent the position of the proposed *parS* sites from [21]. Red italicized letters indicated ParB accessory binding sites, and blue italicized letters represents the promoter region of *dnaA*. Grey stars indicate peaks that are less prominent but still found in the different genetic backgrounds. The red dotted lines indicate the significant enrichment. Precise description of the different peaks is given in S1 Table.

doi:10.1371/journal.pgen.1006428.g001

ChIP-seq analysis revealed eight additional secondary ParB binding sites that do not contain putative *parS* sequences (Fig 1 and S1 Table). However, the enrichment profile at these sites is different from that obtained with the four *parS* sites involved in chromosome segregation, as no “spreading” was observed (S2A Fig). As a control, we performed ChIP-seq experiments in a strain lacking the ParB-3xFLAG protein, and no enrichment was observed around the *parS* sites and the ParB secondary binding sites mentioned above (S2B, S2C and S2D Fig).

A single *parS* site is sufficient to sustain chromosome segregation

To study the role of ParB binding sites in chromosome segregation and positioning inside the cell, we inactivated the *parS* sites bound by ParB. Several point mutations were introduced in *parS1* and *parS2* and unmarked deletion of *parS3* and *parS4* were performed (see S1 Text).

No obvious growth defect could be observed when *parS1*, *parS2* and *parS3* were inactivated (alone or in combination), in contrast to when the four *parS* sites were inactivated, which is consistent with results from Jecz and colleagues [27]. Therefore, we focused our study on the mutant presenting only one functional *parS* site ($\Delta parS123$) and the mutant defective in all four *parS* sites ($\Delta parS1234$). We first measured their growth ability in minimal medium supplemented with glucose and casamino acids. The generation time of the $\Delta parS123$ mutant was similar to that of the wild type strain (50 and 47 minutes, respectively, Fig 2 and S3 Fig), whereas the generation time of the $\Delta parS1234$ mutant was considerably increased (81 minutes), as observed for the $\Delta parB$ mutant [26]. The amount of anucleate cells was also low for the wild type strain and the $\Delta parS123$ mutant (0.7 and 1% respectively, Fig 2), in contrast to the $\Delta parS1234$ mutant (approximately 25%). In agreement with these results, the positioning of chromosomal tags located near *oriC* and *dif* was the same in the wild type strain and in the $\Delta parS123$ mutant (S4 Fig). In contrast, it was strongly affected in the $\Delta parS1234$ mutant (S4 Fig), like in the $\Delta parB$ and $\Delta parA$ mutants (previously described in [26]).

To further confirm that a single *parS* site bound by ParB is sufficient to sustain proper chromosome segregation in *P. aeruginosa*, we re-introduced a *parS2* site 6.5 kb away from *oriC* (downstream of *gyrB*) in the $\Delta parS1234$ mutant. The resulting strain ($\Delta parS1234 parS2 +6.5$) presents a generation time and an amount of anucleate cells only slightly higher than the wild type strain (Fig 2). We also introduced a sequence that is not efficiently bound by ParB *in vivo* (TCTTCCTCGTGGAAACA, referred as *parS9* in [21] and [27]) at the exact same location. The resulting strain ($\Delta parS1234 parS9 +6.5$) presents a generation time and an amount of anucleate cells similar to the $\Delta parS1234$ mutant (Fig 2). These results indicate that a single *parS* site bound by ParB is enough to sustain proper chromosome segregation, and that a *parS*-derived sequence containing 2 mismatches from the consensus sequence TGTTCACGTGGAAACM is not, probably due to the fact that it is not recognized by ParB *in vivo*.

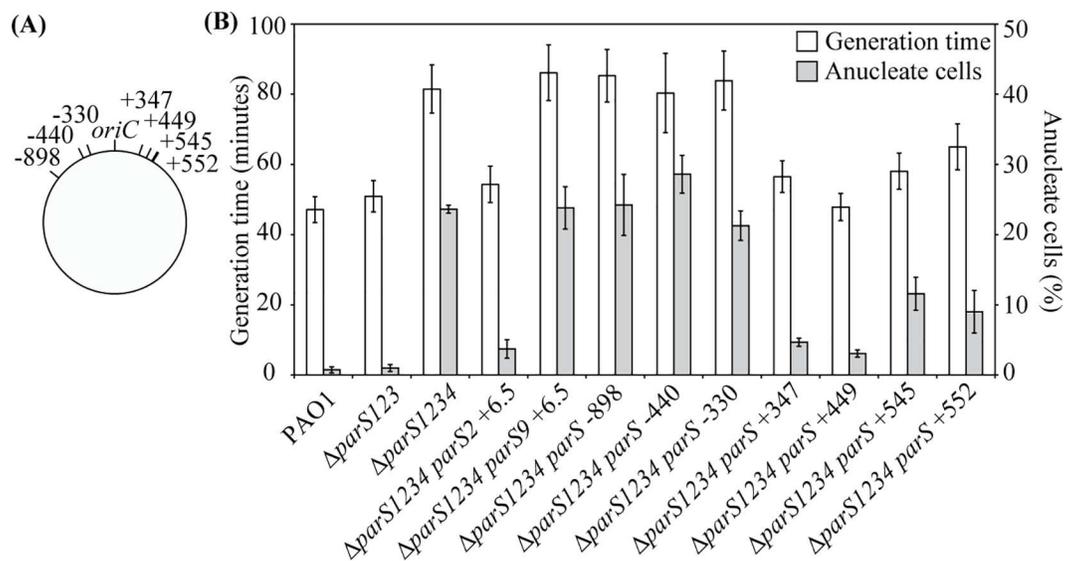


Fig 2. Impact of *parS* site location on the chromosome on generation time and amount of anucleate cell found in liquid cultures. (A) Schematic representation of the position of the *parS* sites introduced in the $\Delta parS1234$ mutant. (B) Generation times (white bars, scale on the left axis) and percentage of anucleate cell (grey bars, scale on the right axis) of the different strains used in this study. Histograms and error bars represent the mean and standard deviation for at least three independent experiments. Strains IVGB469 ($\Delta parS123$), VLB1 ($\Delta parS1234$), VLB63 ($\Delta parS1234 parS2 +6.5$), VLB62 ($\Delta parS1234 parS9 +6.5$), VLB69 ($\Delta parS1234 parS -898$), VLB70 ($\Delta parS1234 parS -440$), IVGB481 ($\Delta parS1234 parS -330$), VLB66 ($\Delta parS1234 parS +347$), IVGB479 ($\Delta parS1234 parS +449$), VLB73 ($\Delta parS1234 parS +545$) and IVGB480 ($\Delta parS1234 parS +552$) were used.

doi:10.1371/journal.pgen.1006428.g002

ParB secondary binding sites are not sufficient for correct chromosome segregation

To characterize ParB binding to *P. aeruginosa* chromosome in the $\Delta parS123$ and $\Delta parS1234$ mutants, we replaced the chromosomal copy of the *parB* gene by a gene encoding the 3xFLAG tagged version of ParB and performed ChIP-seq experiments. Results presented in [Fig 1B and 1C](#) and [S1 Table](#) indicate that more than 8 kb surrounding the *parS4* site are enriched in the $\Delta parS123$ mutant, whereas no enrichment could be detected around the localization of the *parS* sites in the $\Delta parS1234$ mutant. This suggests that a nucleoprotein complex is formed by ParB from a single *parS*. Moreover, the secondary sites identified in the wild type strain were also bound by ParB in the $\Delta parS123$ and $\Delta parS1234$ mutants. An additional secondary site upstream of *dnaA* was identified. This site is also present in the wild type strain, but it is included in the large region enriched around the *parS* sites ([Fig 1A](#)). Considering that the chromosome segregation defect of the $\Delta parS1234$ mutant is similar to that of the $\Delta parB$ mutant, the fact that ParB is bound to the secondary sites in the $\Delta parS1234$ mutant suggests that they are not sufficient for correct chromosome segregation. Moreover, no binding of ParB to the *parS* putative sequences identified *in vitro* in [21] and [27] was observed in the $\Delta parS123$ and $\Delta parS1234$ mutants, indicating that even in the absence of the major ParB binding sites, these sequences are not bound by ParB *in vivo*.

The position of *parS* on the chromosome is critical for efficient chromosome segregation

To investigate the impact of the *parS* site position on chromosome segregation, we reintroduced a *parS* site at different locations in a $\Delta parS1234$ mutant. We could not obtain and/or propagate strains with a *parS* site located 1 or 1.5 Mb from *oriC* on the right replichore (in contrast to what was described with the PAO1161 strain [27]). However, we could generate strains with a *parS* site located between 898 kb from *oriC* on the left replichore to 550 kb from *oriC* on the right one ([Fig 2A](#)). We analyzed growth rate and chromosome segregation in these strains, by measuring the generation time and the amount of anucleate cells present in liquid culture in minimal medium supplemented with glucose and casamino acids. Results are shown in [Fig 2B](#). Compared to the $\Delta parS1234$ mutant, strains $\Delta parS1234 parS -898$, $\Delta parS1234 parS -440$ and $\Delta parS1234 parS -330$ (which carry a *parS* site 898, 440 and 330 kb from *oriC* on the left replichore, respectively, [Fig 2A](#)) present a similar generation time (more than 80 minutes), and a similar amount of anucleate cells (more than 20%). In contrast, generation times of strains $\Delta parS1234 parS +347$, $\Delta parS1234 parS +449$, $\Delta parS1234 parS +545$ and $\Delta parS1234 parS +552$ (which carries a *parS* site on the right replichore) were significantly different from the generation time of the $\Delta parS1234$ mutant, closer to the generation time of the $\Delta parS123$ mutant (56, 48, 58 and 65 minutes respectively). In addition, the amount of anucleate cells are significantly reduced in these strains compared to the $\Delta parS1234$ mutant (4, 2, 11 and 9% respectively, compared to 25% for the $\Delta parS1234$ mutant), even if these amounts are significantly higher than what is observed in the $\Delta parS123$ mutant (less than 1%). These results indicate that the efficiency of chromosome segregation depends on the location of the *parS* site on the chromosome, suggesting a regional control of this process.

ParB binding to *parS* is independent of ParA and of the *parS* location on the chromosome

To investigate the apparent difference in functionality of the *parS* site depending of its location on the chromosome, we first tested its ability to be bound by ParB. We built a functional

GFP-ParB fusion (see [S1 Text](#)) that we used to visualize ParB in different genetic backgrounds. The gene encoding this fusion is expressed from a plasmid (called pPSV38-NGFP-ParB). It is under the control of an IPTG-inducible *lacUV5* promoter flanked by two *lac* operators, strictly repressed in *P. aeruginosa* in absence of IPTG ([28] and S. L. Dove personal communication). This pPSV38-NGFP-ParB plasmid was introduced in different strains containing a native copy of *parB*. We used the minimal amount of IPTG to visualize this fusion without interfering with the cell physiology (overexpression of *parB* is toxic in *P. aeruginosa*, [21]). The ability of GFP-ParB to form foci in these strains was assessed using fluorescent microscopy to visualize the GFP fusion. In the $\Delta parS123$ mutant, more than 90% of the cells contained 2 foci ([S2 Table](#)), whereas no visible focus could be observed in the $\Delta parS1234$ mutant. This indicates that foci formation depends on ParB binding to a *parS* site, and probably of the formation of a nucleoprotein complex (illustrated by spreading of ParB around the *parS* site, see above). Indeed, secondary sites are bound by ParB in the $\Delta parS1234$ mutant (see above), but this binding in the absence of spreading does not result in visible foci. Also, no focus could be observed when the pPSV38-NGFP-ParB plasmid was introduced in the $\Delta parS1234 parS9 +6.5$ mutant (containing only a *parS*-derived sequence with 2 mismatches from the consensus sequence).

Strikingly, when the pPSV38-NGFP-ParB plasmid was introduced in strains containing a *bona fide parS* site at different locations on the chromosome ($\Delta parS1234 parS +347$, $\Delta parS1234 parS +552$ and $\Delta parS1234 parS -898$) or in the $\Delta parA$ mutant, a majority of cells contained foci when observed using fluorescent microscopy ([S2 Table](#)). We noticed that the proportion of cells without visible fluorescent focus was higher in the $\Delta parS1234 parS -898$ and in the $\Delta parA$ mutant than in the wild type strain, which is in agreement with the higher proportion of anucleate cells observed with these strains. These results indicate that, in contrast with efficient chromosome segregation, ParB binding to *parS* is not dependent on ParA and on the *parS* position on the chromosome.

Localization of the ParB/*parS* complex near the 0.2/0.8 relative cell length is dependent on ParA but not on *parS* location on the chromosome

The 2 fluorescent foci observed in the $\Delta parS123$ mutant containing the pPSV38-NGFP-ParB plasmid are positioned close to the 0.2/0.8 relative cell length, with an average interfocal distance of 0.6 relative cell length ([Fig 3](#)). Strikingly, when the pPSV38-NGFP-ParB plasmid was introduced in the $\Delta parS1234 parS +347$, $\Delta parS1234 parS +552$ and $\Delta parS1234 parS -898$ strains (presenting 4%, 9% and 25% of anucleate cells, respectively), ParB positioning was not affected, remaining close to the 0.2/0.8 relative cell length independently of the *parS* site position on the chromosome ([Fig 3](#)). In contrast, when the pPSV38-NGFP-ParB plasmid was introduced in a $\Delta parA$ mutant, foci were mispositioned and their interfocal distance was strongly reduced ([Fig 3](#)). These results indicate that ParB bound to *parS* is positioned near the 0.2/0.8 relative cell length in a ParA dependent manner, but independently of the location of *parS* on the chromosome.

To determine whether the ParB/*parS* complex positioning at the 0.2/0.8 relative cell length impacts chromosomal loci adjacent to *parS*, we analyzed the localization of chromosomal tags in different strains. We used three different tags, located 327 kb or 628 kb from *oriC* on the right replichore, or 851 kb from *oriC* on the left replichore (327-R, 628-R and 851-L, respectively). We compared their positioning inside the cell in the $\Delta parS1234$ mutant with their positioning when a *parS* site was located close by (in the $\Delta parS1234 parS +347$, $\Delta parS1234 parS +552$ and $\Delta parS1234 parS -898$ strains, respectively). As a control, we used a chromosomal tag

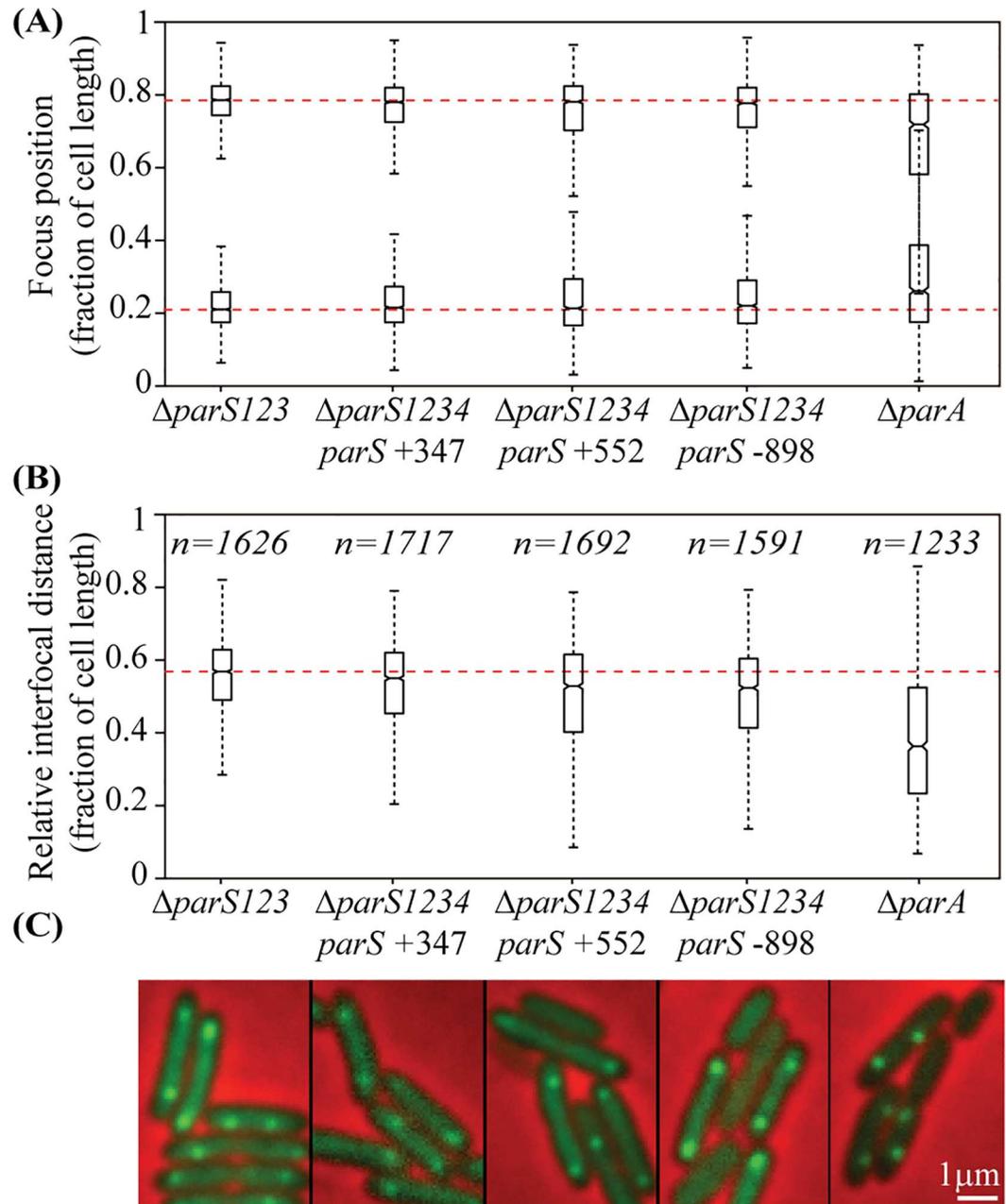


Fig 3. ParB binding to *parS* in the presence of ParA induces its positioning to the 0.2/0.8 relative cell length. The pPSV38-NGFP-ParB plasmid was introduced in different strains, and NGFP-ParB localization was observed in cells grown in minimal medium supplemented with citrate. Foci numbers for each strain are indicated in S2 Table. (A) represents the localization of the 2 foci in cells (randomly oriented) containing two foci, for each genetic background, whereas (B) represents the distance between the two foci. Boxplot representations are used, indicating the median (horizontal bar), the 25th and the 75th percentile (open box) and the rest of the population except for the outliers (whiskers). Outliers are defined as $1.5 \times IQR$ or more above the 75th percentile or $1.5 \times IQR$ or more below the first 25th percentile quartile. Representative images are shown in (C). Scale bar is indicated. Raw data are presented in S5 Fig. Strains IVGB469 ($\Delta parS123$), VLB66 ($\Delta parS1234 parS +347$), IVGB480 ($\Delta parS1234 parS +552$), VLB69 ($\Delta parS1234 parS -898$) and IVGB317 ($\Delta parA$) were used.

doi:10.1371/journal.pgen.1006428.g003

located 82 kb from *oriC* on the right replichore. As previously described, this tag is positioned at the 0.2/0.8 relative cell length in the wild type strain (with an interfocal distance of 0.6

relative cell length), and this positioning is lost in a $\Delta parS1234$ mutant. Results presented in Fig 4 indicate that all three chromosomal tags are positioned near the 0.2/0.8 relative cell length when a *parS* site is located nearby (at 20 kb, 76 kb and 47 kb from the observed tag, respectively), in contrast to what happens in a $\Delta parS1234$ mutant. This is surprisingly also the case for the $\Delta parS1234 parS$ -898 strain, which presents 25% of anucleate cells, a level similar to that of the $\Delta parS1234$ mutant.

The *parS* site is the site of force exertion during the segregation process

We analyzed the impact of the *parS* site chromosomal location on chromosomal loci separation after replication. We used strains with two chromosomal tags allowing to visualize two chromosomal loci in the same cells: one close to *oriC*, and another farther away. We compared the number of foci visible in the wild type strain (in which the four *parS* located between 3 and 15 kb of *oriC* are assimilated to one *parS*) with the number of foci visible in a strain containing an ectopic *parS*. The rationale was that to appear as 2 foci, a chromosomal locus must be replicated and separated upon replication. We used three combinations of chromosomal loci to analyze the impact of three *parS* positions that lead to different amount of anucleate cells: *parS* +347 (less than 5%); *parS* -898 (around 25%); and *parS* +552 (around 10%) (see Fig 2). Complete foci repartitions for each strain are shown in S6 Fig. Fig 5 considers only the cells for which 3 foci are visible, *i.e.* cells in which one chromosomal locus was separated after replication but not the other. In the wild type background, the chromosomal locus close to *oriC* was separated first in more than 90% of the 3 foci cells, which is expected considering that it is replicated first and also close to the *parS* sites. Strikingly, in the ectopic *parS* backgrounds, more than 80% of the 3 foci cells contained 1 focus for the locus proximal to *oriC* (replicated first) and 2 foci for the locus located proximal to the *parS* site, (replicated last). This indicates that an active process is required to separate replicated chromosomal loci, and that it originates from the *parS* site, which thus appears to be the site of force exertion of the segregation process.

Altogether, these results show that inserting a *parS* site at an ectopic location induces a repositioning of this *parS* site and of the adjacent chromosomal loci, and that *parS* are the first sequences to be separated after replication. This is strikingly the case for all three tested locations of *parS*, despite the fact that the $\Delta parS1234 parS$ +347, $\Delta parS1234 parS$ +552 and $\Delta parS1234 parS$ -898 strains produce different amount of anucleate cells, as observed upon nucleoid staining. This suggests that the defect in chromosome segregation observed in the $\Delta parS1234 parS$ -898 strain does not originate from the inability of the ParABS system to position chromosomal loci flanking the *parS* site close to the 0.2/0.8 relative cell length.

Identification of a “competence zone” for *P. aeruginosa parS* site

To better characterize the position effect of the *parS* site, independently of putative local effects due to *parS* insertion, we used a high-throughput approach. We inserted a *parS* site in a *mariner* transposon (modified from the pSC189 vector, [29]), and used it to generate a randomly inserted transposon library in the $\Delta parS1234$ mutant. A *parS* site inserted at a position for which chromosome segregation occurs correctly (few anucleate cells) is expected to have a fitness advantage. Therefore, although the transposon library would have *parS* inserted at random locations over the genome, the ones having a *parS* in position allowing correct chromosome segregation would be enriched during the propagation. As a control, an insertion library built with a transposon without *parS* was carried out in parallel and insertion sites of these 2 libraries were then identified according to the protocol described in [30] (see Methods for details).

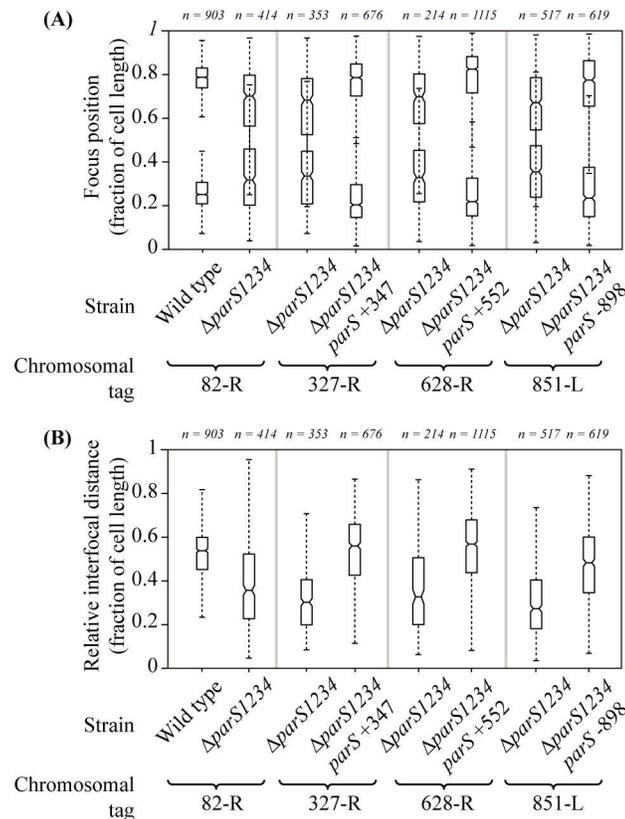


Fig 4. Positioning inside the cells of chromosomal loci located close to an ectopic *parS* site. (A) represents the localization of the 2 foci in cells (randomly oriented) containing two foci, for each genetic background, whereas (B) represents the interfocal distance between these two foci. Boxplot representations are used, indicating the median (horizontal bar), the 25th and the 75th percentile (open box) and the rest of the population except for the outliers (whiskers). Outliers are defined as $1.5 \times IQR$ or more above the 75th percentile or $1.5 \times IQR$ or more below the first 25th percentile quartile. Genetic background in which each locus is observed are indicated, as well as the number of cells considered. Positions of the chromosomal tags: 82-R, +82 kb from *oriC* (strains IVGB492 and VLB21); 327-R, +327 kb from *oriC* (strain IVGB478); 628-R, +628 kb from *oriC* (strains VLB23 and VLB140); 851-L, -851 kb from *oriC* (strains IVGB509 and IVGB510).

doi:10.1371/journal.pgen.1006428.g004

Ratios between the number of insertions using the two transposons are presented in Fig 6. A clear enrichment of *parS* insertions is observed in the region between approximately -200 kb to +450 kb from *oriC*. It is due to a very strong bias of insertions obtained with the *mariner* transposon containing a *parS* site, but not the control transposon. This indicates that insertion of a *parS* site in this region provides a growth advantage compared to the $\Delta parS1234$ mutant, whereas an insertion of a *parS* site outside of this region does not. We will refer to this region as the «competence zone» of the *parS* site. In agreement with our previous results, *parS* sites inserted on the left of *oriC* in the $\Delta parS1234$ (respectively -898, -440 and -330) are located outside of the «competence zone», whereas the *parS* sites inserted on the right of *oriC* are inside (+347 and +449) or at the extreme limit of it (+545 and +552).

Remarkably, we noticed that the «competence zone» is not centered on the *parS* native position, in the vicinity of *oriC*, and that the left border might coincide with a ribosomal operon (located at -220kb on the left of *oriC*). We deleted this ribosomal operon in the $\Delta parS1234$ *parS* -330 and $\Delta parS1234$ *parS* -898 strains (generating strains $\Delta parS1234$ *parS* -330 $\Delta rrrnD$ and

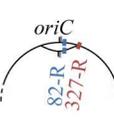
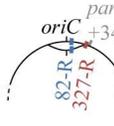
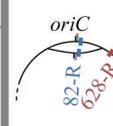
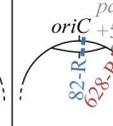
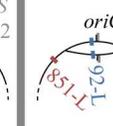
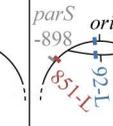
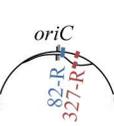
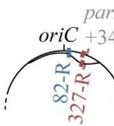
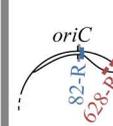
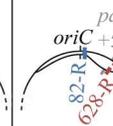
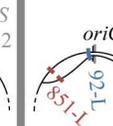
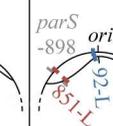
	Chromosomal tags 82-R and 327-R		Chromosomal tags 82-R and 628-R		Chromosomal tags 92-L and 851-L	
	Wild type	$\Delta parS1234$ <i>parS</i> +347	Wild type	$\Delta parS1234$ <i>parS</i> +552	Wild type	$\Delta parS1234$ <i>parS</i> -898
Two foci for the locus closer to <i>oriC</i> One focus for the locus farther away (2 blue x 1 red)	 92 %	 7 %	 96 %	 14 %	 95 %	 18 %
One focus for the locus close to <i>oriC</i> Two foci for the locus farther away (1 blue x 2 red)	 8 %	 93 %	 4 %	 86 %	 5 %	 82 %
	<i>n</i> =119	<i>n</i> =113	<i>n</i> =198	<i>n</i> =305	<i>n</i> =183	<i>n</i> =252

Fig 5. The *parS* site is the site of force exertion of the segregation process. Fractions of cells presenting 3 foci for two chromosomal tags in different genetics background (shown in top) are indicated in the wild type strain, and in a strain with an ectopic *parS*. Numbers of cell considered are shown below. Schematics of the different chromosomal configurations are represented; the position of the *parS* site is indicated in grey, the position of *oriC* in black, and chromosomal loci in blue and red. Strains IVGB292, IVGB168 and IVGB173 were used for the wild type background, as well as strains IVGB478 ($\Delta parS1234$ *parS* +347 background), VLB140 ($\Delta parS1234$ *parS* +552 background) and IVGB510 ($\Delta parS1234$ *parS* -898 background).

doi:10.1371/journal.pgen.1006428.g005

$\Delta parS1234$ *parS* -898 $\Delta rrrnD$), and analyzed the efficiency of chromosome segregation in the resulting strains by nucleoid staining. The proportion of anucleate cells in the $\Delta parS1234$ *parS*

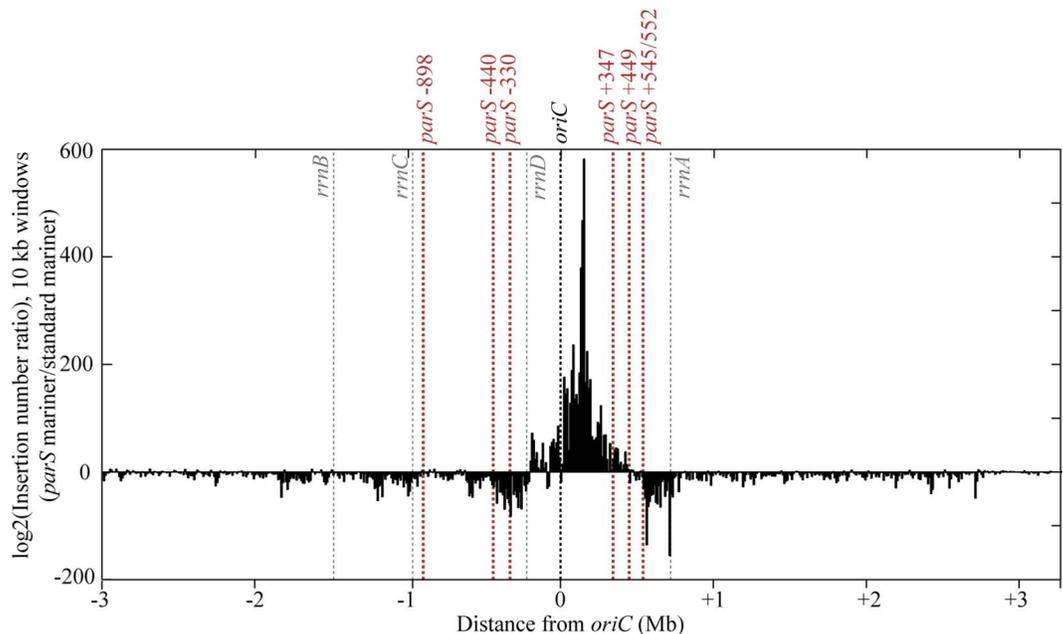


Fig 6. Identification of the “competence zone” of *P. aeruginosa* *parS* site. Log₂ of ratio of insertion numbers (normalized to the total number of reads for each experiment) of a *mariner* transposon containing a *parS* site and a standard *mariner* transposon in the $\Delta parS1234$ mutant, calculated for 10 kb windows, and represented according to the distance from *oriC*. The black dashed line represents the position of *oriC*, the grey dashed lines the position of the ribosomal operons, and the red dashed lines the position of the *parS* sites introduced in the $\Delta parS1234$ mutant presented in this study (Fig 2).

doi:10.1371/journal.pgen.1006428.g006

-330 $\Delta rrnD$ strain was strongly reduced compared to the $\Delta parS1234 parS -330$ strain (2% compared to 20%), indicating that the *rrnD* operon, which is located between *parS* and *oriC*, impairs chromosome segregation (Fig 7). We note however that the proportion of anucleate cells in the $\Delta parS1234 parS -898 \Delta rrnD$ strain was close to 20%, indicating that deleting the *rrnD* operon does not restore efficient chromosome segregation in a strain containing a *parS* site located 898 kb on the left of *oriC*. Altogether the observed asymmetry of the competence zone is likely due to the presence of the *rrnD* operon between *oriC* and *parS*.

The *parS* «competence zone» is determined by the proximity between *parS* and *oriC*

To identify genetic determinants of the *parS* «competence zone», we used the λ derived site-specific recombination system [31] to invert chromosomal fragments and bring specific sequences closer to *parS* sites located outside of the «competence zone». The impact of these programmed chromosome rearrangements on anucleate cell formation was then analyzed by nucleoid staining.

More specifically, we inserted a *parS* site next to an *attL* site at position 851-L (851 kb on the left of *oriC*, see methods), and *attR* sites at three positions: 92-L (-92 kb from *oriC*), 82-R (+82 kb from *oriC*) or 327-R (+327 kb from *oriC*). Recombination between *attL* and *attR* sites upon Int and Xis action led to the inversion of the chromosomal region between these sites, whereas the position of the *parS* site remains unchanged. The amount of anucleate cells observed in the inverted strains was compared to the one in the parental strains (Fig 8A). In the case of *attR* 92-L, no difference in anucleate cells could be detected whereas with *attR* 82-R and 327-R, a significant decrease was observed in the inverted strains compared to the non-inverted strains. Therefore, when a *parS* is located at position 851-L, efficient chromosome segregation can occur when *oriC* is moved to a closer position (only 83 kb or 328 kb away from *parS*, respectively). It is noteworthy to mention that in these strains, *rrnD* is not located between *parS* and *oriC* (Fig 8A).

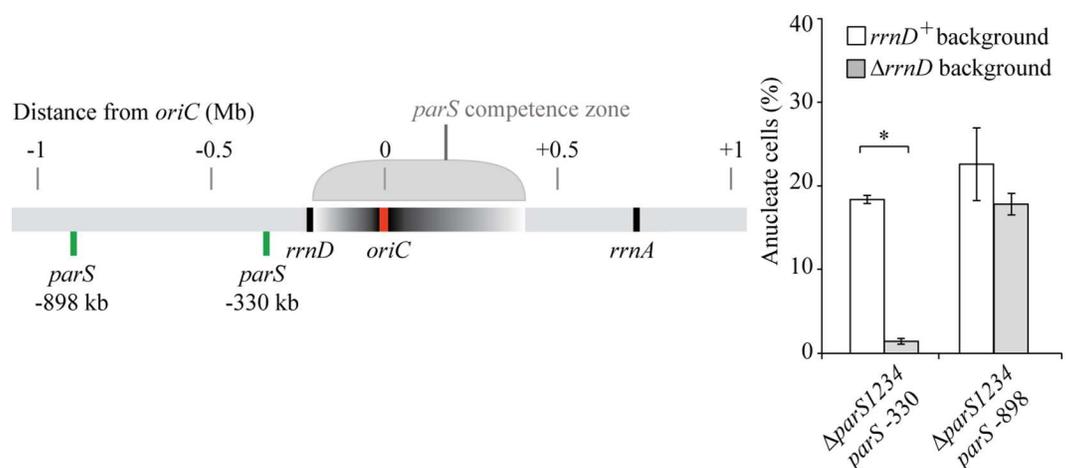


Fig 7. Impact of *rrnD* deletion on the amount of anucleate cells found in liquid culture for strains containing a *parS* site located 330 and 898 kb on the left of *oriC* ($\Delta parS1234 parS -330$ (strains IVGB481 and IVGB524) and $\Delta parS1234 parS -898$ (strains VLB69 and IVGB526), respectively). A schematic representation of the positioning of *parS* and *rrnD* on the chromosome is shown on the left. Histograms and error bars represent the mean and standard deviation for at least three independent experiments. Significant differences between strains were determined by *t* test. *, $P < 0.001$.

doi:10.1371/journal.pgen.1006428.g007

The same approach was used to analyze the right side of the «competence zone»: an *attL* site next to a *parS* site was inserted at position 628-R (628 kb on the right of *oriC*), and *attR* sites were inserted at positions 327-R, 82-R or 92-L respectively. Remarkably, a significant decrease in anucleate cells production was only observed in the inverted strain containing the *attR* 92-L, i.e. when *oriC* was translocated 93 kb away from *parS* (Fig 8B).

Altogether, these results demonstrate that genetic determinant(s) of the *parS* «competence zone» is located between -92 kb and +82 kb from *oriC*. This region encompasses a number of essential genes, but its most striking feature is that it contains *oriC* itself. Therefore, we propose that the «competence zone» is defined by the distance between *oriC* and *parS*, and that proximity between these two sequences is critical for efficient chromosome segregation.

Discussion

In vivo binding of ParB in *P. aeruginosa*

Using a ChIP-seq approach, we identified 4 strong ParB binding sites *in vivo*, which allow us to define the TGTTCACGTGGAACM sequence as the *P. aeruginosa* *parS* site. Although *in*

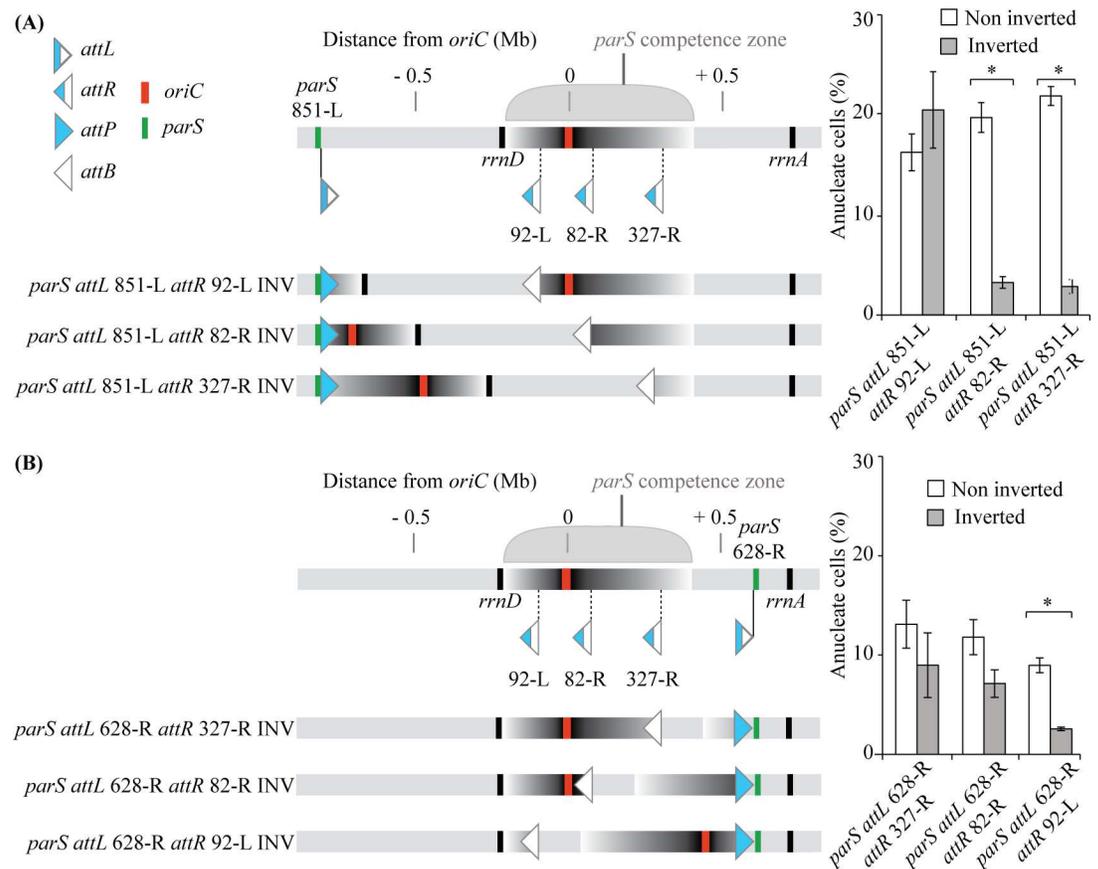


Fig 8. Genetic analysis of the *parS* “competence zone”. Generation of programmed chromosome rearrangements (using the lambda derived recombination system) bringing part of the “Competence zone” closer to a *parS* site located 851 kb on the left of *oriC* (A) or 628 kb on the right of *oriC* (B). Schematic representations of the inverted regions, as well as the position on the chromosome of the *parS*, *attL* and *attR* sites, *oriC* and *rrn* operons are shown on the left. Impact of these inversions on the amount of anucleate cells is shown on the right. Histograms and error bars represent the mean and standard deviation for at least three independent experiments. Significant differences between strains were determined by *t* test. *, $P < 0.001$. Strains VLB271, VLB272, VLB 273, VLB276, VLB277 and VLB278 were used in (A), and strains IVGB556, IVGB557, IVGB558, VLB333, VLB334 and VLB335 were used in (B).

doi:10.1371/journal.pgen.1006428.g008

in vitro 2 mismatches did not affect ParB binding to this sequence drastically, [21,27], no significant enrichment of such degenerated sequences was detected *in vivo*, either in the wild type strain or in the strain deprived of the 4 *bona fide* *parS* sites. We also demonstrate that re-positioning a 2 mismatches sequence closer to *oriC* does not allow ParB binding.

Interestingly, we identified nine secondary binding sites for ParB. These sites are less efficiently bound than the *parS* sites, no major “spreading” phenomenon could be observed, and these sites are not involved in chromosome segregation. They might be involved in transcriptional regulation by ParB, and this is of particular interest in the case of the secondary site identified in the promoter region of *dnaA*, a gene encoding the replication initiation protein in bacteria. A link between the ParABS system and the regulation of replication initiation has been characterized in *B. subtilis* and *V. cholerae* chromosome I. However, it most probably occurs post-transcriptionally, through the interaction of ParA with DnaA, and not at the transcriptional level [32]. The mechanism of ParB binding to these secondary sites and their biological significance remain to be characterized.

It is noteworthy to mention that the enrichment profiles surrounding the *parS* sites encompasses more than twenty kb and is compatible with the presence of ParB molecules involved either in a “spreading and bridging” mechanism [11], or a “nucleation and caging” mechanism [12] of binding. This is consistent with the fact that it was previously shown that *P. aeruginosa* ParB was able to bridge DNA *in vitro* [10].

Functioning of the ParABS system of *P. aeruginosa*

We show that in our growth conditions, one *parS* site is sufficient to promote proper chromosome segregation, as was described in the study from Jecz and colleagues [27]. However, the amount of anucleate cells in a strain deprived of *parS* sites differs between the 2 studies (more than 20% in our case, in contrast to 2–3% in the work of Jecz and colleagues [27]). We use a PAO1 isolate that presents differences from the sequenced isolate [33], whereas they use the PAO1161 strain, which is a derivative of the sequenced PAO1 [19], which might account for this difference. In this study, we also demonstrate that the location of the *parS* site on the chromosome is critical for chromosome segregation (as assessed by measuring growth rate and anucleate cells in liquid cultures), and identify what we called a «competence zone» for *parS*, which ranges roughly from 200 kb on the left of *oriC* (where it is limited by *rrnD*) to 450 kb on its right. Strikingly, we were unable to construct and propagate strains containing a *parS* site located at either 1.5 Mb or 1 Mb on the right of *oriC*, suggesting that the introduction of a *parS* site far from *oriC* can be more detrimental for growth than the absence of *parS* site.

We also determined that ParB binds to *parS* independently of ParA and of the *parS* location on the chromosome, and that ParB bound to *parS* is positioned to the 0.2/0.8 relative cell length. This localization depends on ParA, but not on the *parS* location on the chromosome. These results suggest a repositioning of the chromosomal region containing the *parS* site due to the ParB and ParA proteins, which could be linked to an “anchorage process” through ParA. Indeed, a repositioning of chromosomal loci containing ectopic *parS* has been previously described in *Caulobacter crescentus* [34] and *V. cholerae* chromosome I [35], two bacteria that possess specific proteins allowing the anchorage of the *parS* sites to the cell pole [36–38]. Interestingly, no anchorage mechanism to cellular positions other than cell poles has been described so far. In contrast, introduction of *parS* arrays at different locations on the *B. subtilis* chromosome does not induce a repositioning of the chromosomal loci in which they are inserted [39], and no anchorage process was described in this bacterium. Subpolar positioning of *parS* sites have also been described in *Myxococcus xanthus*, however the impact of their displacement on chromosomal loci positioning has not been assessed yet [40].

Proximity between the *parS* site and *oriC* define a «competence zone» for segregation

By engineering chromosome rearrangements using a lambda-based recombination system, we demonstrate that the «competence zone» is linked to the distance between *parS* and *oriC*. Strikingly, this is in perfect agreement with the observation that *parS* sites are found near *oriC* in the vast majority of bacterial species [6], although a functional link was not demonstrated previously. In contrast, it was reported that *parS* sites could be moved 650 kb away from *oriC* in the 3 Mb long *V. cholerae* chromosome I without impacting the efficiency of chromosome segregation [35]. Similarly, no defect was described when *parS* sites were displaced 400 kb away of *oriC* in the 4 Mb long *C. crescentus* chromosome [41]. To our knowledge, the only previous hint of functional coupling between *parS* site and *oriC* has been described in *B. subtilis*. In this bacterium, the chromosome segregation defect observed when *parS* sites were inserted near the terminus of replication was mainly due to the recruitment of the SMC condensin away from *oriC*. SMC is the prominent factor involved in *B. subtilis* chromosome segregation [14]. In *P. aeruginosa*, a Δsmc mutant presents only a slight defect in chromosome segregation [25]. However, we were not able to delete *smc* in the $\Delta parS1234 parS$ -898 strain, and deletion of *smc* in the $\Delta parS1234 parS$ -330 $\Delta rrnD$ strain leads to an increase in anucleate cells (from approximately 1% to approximately 7%), which indicates that unlike the situation described in *B. subtilis*, the segregation defect observed when the *parS* site is distant from *oriC* is not linked to SMC function.

In this study, we establish that the *parS* site is the site of force exertion of the segregation process, (as described in *C. crescentus* [41]); indeed, chromosomal loci close to the *parS* site are the first to be separated after replication. Moreover, they reach the 0.2/0.8 relative cell length upon segregation, independently of *parS* location on the chromosome. Strikingly, this is also the case in the $\Delta parS1234 parS$ -898 strain for which more than 20% of anucleate cells are observed. This suggests that chromosome segregation in this strain does not originate from a defect of positioning of the chromosomal loci surrounding the *parS* site, or from a defect in the «segregation force» itself. Our demonstration that bringing *oriC* closer to the *parS* site restores proper chromosome segregation indicate that the timing of separation of the chromosomal loci surrounding *oriC* after replication initiation might be critical, and that it is normally determined by the distance between *oriC* and *parS*. When this distance is too large, or when a *rrn* operon is located between *parS* and *oriC*, the «segregation force» is still applied but the timing of separation of *oriC* is lost, and this is detrimental for the segregation process. Interestingly, two studies in *B. subtilis* also indicate that a failure in separating newly replicated origins is detrimental for the segregation process [42,43]. However, the specific problems arising from the delayed separation of the replicated *oriC* remains to be characterized.

It was previously shown that *rrn* operon can interfere with chromosome organization and form conformational barriers [17,44]. It was proposed that these barriers serve as flexible tethers creating a spatial gap between domains, which might be consistent with our results: when such a barrier is inserted between *parS* and *oriC* in *P. aeruginosa*, the timing of separation of replicated *oriC* is lost, even if the *parS* site is not too far from *oriC*. An alternative explanation might be that *rrn* operons are transcribed altogether, in a nucleolus-like structure, which would interfere with the segregation process originating from *parS*, and impair once again the timing of *oriC* separation. However, even if clusters of RNA polymerase have been observed [45], the existence of nucleolus-like structure in bacteria remains to be proven. The presence of a ribosomal operon between *oriC* and the *parS* site is not always detrimental to chromosome segregation. Indeed, this is the case for *Vibrio cholerae* chromosome I (rDNA found at + 53 kb from *oriC* when the 3 *parS* sites are at + 63, + 66 and + 69 kb from *oriC*), and several ribosomal operons alternate with *parS* sites on the *oriC* proximal part of the right chromosomal arm in *B.*

subtilis. In both cases however, the impact of the ParABS system impairment on chromosome segregation is marginal.

Overall, this study demonstrates a functional link between *oriC* and *parS* in *P. aeruginosa*. It suggests that the timing of separation of the chromosomal loci surrounding *oriC* after replication is critical, and that it could be an important role of the ParABS system to keep this timing right, which would explain the proximity of *parS* and *oriC* in most bacterial species.

Materials and Methods

Strains and media

P. aeruginosa strain PAO1 was initially provided by Arne Rietsch (Case Western Reserve University). This PAO1 isolate does not present the inversion described for the sequenced PAO1-UW subclone resulting from homologous recombination between the *rrnA* and *rrnB* loci, which are orientated in opposite directions and separated by 2.2 Mbp [19]. It also contains the 12 kb insertion and 1006 bp deletion described in [33]. *Escherichia coli* DH5 α (Invitrogen) and DH5 α λ pir was used as the recipient strain for all plasmid constructions, whereas *E. coli* strains β 2163 [46] and MPFpir [47] were used to mate plasmids into *P. aeruginosa*. Details of plasmid and strain constructions are provided in [S1 Text](#) and [S3 Table](#).

For growth rate and anucleate cells analysis, overnight cultures grown in Lysogeny broth (LB) at 37°C were diluted 300 times in Minimal Medium A (Miller 1992) supplemented with 0.12% casamino acids and 0.5% glucose, and strains were grown at 30°C until they reach an OD of approximately 0.15. For fluorescent microscopy analysis of chromosomal loci and for NGFP-ParB localization, Minimal Medium A supplemented with 0.25% citrate was used. IPTG was added to growth medium at 0.5 mM for observation of chromosomal tags and 0.1 mM for observation of NGFP-ParB until they reach an OD of approximately 0.1.

Fluorescent microscopy analysis

Cells were grown until OD₆₀₀ 0.1, and fixed with an equal volume of a 1×PBS solution containing 5% paraformaldehyde and 0.06% glutaraldehyde. After overnight incubation at 4°C, the cells were washed twice in PBS and then incubated in a solution of 1 μ g ml⁻¹ HOESCHT 33258 (ThermoFisher). After 20 min incubation, the cells were washed in 1×PBS, spread out on agarose pads and observed immediately using a Leica DM6000 microscope, a coolsnap HQ CCD camera (Roper) and Metamorph software.

Chromosomal loci and NGFP-ParB were observed when cultures reached an OD₆₀₀ between 0.05 and 0.1. Cells were then spread out on agarose pads and observed immediately using a Leica DM6000 microscope, a coolsnap HQ CCD camera (Roper) and Metamorph software. Image analysis was performed using the MATLAB-based software MicrobeTracker Suite [48]. Briefly, The MicrobeTracker program was used to identify cell outlines, and SpotFinderZ to detect fluorescent spots inside the cells. Spots and cell outlines were then manually validated using homemade matlab functions [35]. Spot numbers and positions were then analyzed according to cell length.

Chromatin Immunoprecipitation (ChIP)

Formaldehyde was added to 150 ml of culture (Minimal Medium A supplemented with 0.25% citrate, OD₆₀₀ approximately 0.1) to a final concentration of 1% and samples were incubated at room temperature for 30 min. To quench cross-linking reaction, glycine was added to a final concentration of 125 mM and followed by a 10 min incubation at room temperature. Cell pellets were washed three times with 10ml of PBS and then resuspended in 1 ml of lysis buffer

(50 mM Tris-HCl pH 7.4; 150 mM NaCl; 1 mM EDTA; Triton X-100 1%; and Roche Protease Inhibitor Cocktail). Chromosomal DNA was sheared by sonication to an average size of 0.5–1 kb. After the removal of cell debris by centrifugation, 50 μ l of each sample was removed to serve as an input control. The remaining samples were added to 50 μ l of ANTI-FLAG M2 affinity resin (Sigma A2220) previously washed twice with TBS and twice with lysis buffer. After incubation at 4°C overnight, beads were pelleted and washed twice with TBS Tween 0.5% and three times with TBS. Elution was performed using the 3X FLAG peptide (Sigma F4799), as recommended. The recovered supernatants were placed at 65°C overnight to reverse the cross-links. The input samples were also incubated at 65°C overnight after the addition of 200 μ l of TBS.

ChIP-seq analyses

Library preparation and sequencing were performed by the IMAGIF facility (I2BC, Gif sur Yvette). Sequences were aligned against the reconstituted genome of our PAO1 strain (available on request). The sequencing results were analyzed as described in [49]. Briefly, the number of reads for the input and IP data was smoothed over a 200 bp window (the estimated size of the fractionated DNA), normalized to the total number of reads, and enrichments fold were calculated for each base as the ratio of the number of reads in the IP fraction and the number of reads in the input fraction. Peak calling was done using Matlab functions. Regions presenting a tenfold enrichment were selected, except in the $\Delta par123$ strain, for which an enrichment of 15 was preferred. The rationale was to select for the approximately 10 most abundant regions. Considering that only the 4 *parS* sites are involved in chromosome segregation, further investigation of smaller peaks was not undertaken. Results are presented in S1 Table. Sequencing data are available from the GEO database via accession number GSE87409 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>).

Tn-seq experiments and analysis

The pSC189 vector, described in [29], was modified for use in *P. aeruginosa*. The *aacC1* gene from pEXG2 [50] was PCR amplified and cloned on a *XhoI/NcoI* fragment into the pSC189 vector, giving rise to pSC189Gm. Then, 129 pb containing the *parS3* site were PCR amplified from PAO1 chromosome and cloned on a *XhoI* fragment into the pSC189Gm digested with *Sall*, giving rise to pSC189Gm-*parS*. pSC189Gm and pSC189Gm-*parS* were then transformed into strain MFPpir for further mating into the $\Delta parS1234$ mutant.

Mutant libraries were generated according to [51]. Briefly, donor strains (MFPpir containing whether pSC189Gm or pSC189Gm-*parS*) and recipient strain ($\Delta par1234$) were scraped from overnight plates grown at 37°C and 42°C, respectively. Optical densities were adjusted to 40 for the donor strain and 20 for the recipient strain. Equivalent volumes were mixed, 50 microliter spotted on dried LB plates supplemented with 0.3 mM of DAP (Sigma D1377), and incubated overnight for transposition and selection. Mating mixtures were scraped and plated on Pseudomonas Isolation Agar (Sigma 17208) containing 60 μ g mL⁻¹ of Gentamicin (Sigma G1397). Sixty matings were done, giving rise to approximately 80,000 colonies per mutant library. Colonies were scraped from plates, washed once in LB and froze in 10% DMSO at -80°C in 5 aliquots.

Genomic DNA was prepared from one aliquot using the GenElute™ Bacterial Genomic DNA Kit from Sigma, and sequencing libraries were prepared as described in [30]. Sequencing was performed at the IMAGIF facility (I2BC, Gif sur Yvette). Sequences were aligned against the reconstituted genome of our PAO1 strain to determine the insertion locations of transposons. (Raw data are available from the SRA database (<https://trace.ncbi.nlm.nih.gov/Traces/sra/>) under accession number SRP090425). Ratio between numbers of insertion of the

pSC189Gm-*parS* and pSC189Gm were calculated, log₂ calculated to improve the representation of the data, and results were binned over 10 kb.

Supporting Information

S1 Fig. Construction of a functional ParB-3xFLAG fusion. (A) Schematic representation of the 3xFLAG tag integration vector and its use to construct the PAO1 ParB-3xFLAG strain that synthesizes the ParB protein with a 3xFLAG tag (ParB-3xFLAG) at native levels. (B) Generation times and amounts of nucleate cells of the PAO1 wild type strain and the PAO1 ParB-3xFLAG derivative (Strain IVGB379) (C) Positioning of chromosomal loci located in the Ori region (82-R, left panels) and in the Ter region (3,028-R, right panels) in the PAO1 ParB-3xFLAG and (D) in the PAO1 strains grown in minimal medium supplemented with citrate (respectively strains IVGB396, IVGB397 and IVGB123). The position of the foci in cells containing 1 (upper panels) or 2 (bottom panels) foci are presented. Both loci were visualized individually. Cells for the Ori locus were randomly oriented, whereas cells for the Ter locus were arbitrarily oriented to have foci closer to the 0 pole. (TIF)

S2 Fig. Comparison of ChIP-seq results for ParB-3xFLAG with ChIP-seq results for untagged strain—Identification of secondary peaks specific of ParB binding on *P. aeruginosa* chromosome. (A) Each panel represents a zoom of Fig 1A, of each 10 kb region containing a secondary peak identified in the wild type background. Letters refer to Fig 1 and S1 Table. The red dotted line indicates the 10 fold enrichment limit. (B) Chromatin Immunoprecipitation using an anti-3xFLAG antibody in the PAO1 ParB-3xFLAG strain (Strain IVGB379) or (C) in the PAO1 strain. Enrichment folds between the immunoprecipitated (IP) and the input (IN) fractions are represented for each base of the genome, according to its distance from *oriC*, and ratio of these enrichment folds are represented in (D). The insets represent a zoom of the region containing the four *parS* sites bound by ParB. Dashed vertical lines represent the position of the proposed *parS* sites from [21]. Red italicized letters indicated ParB accessory binding sites, and blue italicized letters represents the promoter region of *dnaA*. Grey stars indicate peaks that are less prominent but still found in the different genetic backgrounds. The red dotted lines indicate the significant enrichment. (TIF)

S3 Fig. Representative growth curves for some of the strains presented in this study. OD₆₀₀ was measured during growth in Minimal Medium supplemented with Glucose and Casamino Acids, and plotted in logarithmic scale according to time. Growth curves for strains PAO1, PAO1 ParB-3xFLAG (IVGB379), $\Delta parS123$ (IVGB469), $\Delta parS1234$ (VLB1), $\Delta parS1234 parS2 +6.5$ (VLB63), $\Delta parS1234 parS +347$ (VLB66) and $\Delta parS1234 parS -440$ (VLB70) are represented. (TIF)

S4 Fig. Impact of the deletion of the *parS* sites bound by ParB *in vivo* upon chromosome positioning inside the cell. Positioning of chromosomal loci located in the Ori region (82-R, left panels) and in the Ter region (2,957-R, right panels) in the wild type PAO1 strain (A) the $\Delta parS123$ mutant (B) and the $\Delta parS1234$ mutant (C) grown in minimal medium supplemented with citrate. The position of the foci in cells containing 1 (upper panels) or 2 (bottom panels) foci are presented. Both loci were visualized in the same cells (using strains IVGB123, VLB13 and VLB21 respectively), which were oriented relative to the Ter locus position (the pole closest to this locus was assumed to be the new pole of the cell). Representative images are shown on the right. The Ori locus is represented in green, and the Ter one in red. (TIF)

S5 Fig. ParB binding to *parS* in the presence of ParA induces its positioning to the 0.2/0.8 relative cell length. The pPSV38-NGFP-ParB plasmid was introduced in different strains, and NGFP-ParB localization was observed in cells grown in minimal medium supplemented with citrate. Foci numbers for each strain are indicated in [S2 Table](#). (A) represents the localization of the 2 foci in cells (randomly oriented) containing two foci, for each genetic background, whereas (B) represents the distance between the two foci. Strains IVGB469 ($\Delta parS123$), VLB66 ($\Delta parS1234 parS +347$), IVGB480 ($\Delta parS1234 parS +552$), VLB69 ($\Delta parS1234 parS -898$) and IVGB317 ($\Delta parA$) were used.
(TIF)

S6 Fig. Foci number repartitions in strains containing chromosomal tags allowing the visualization of two chromosomal loci (82-R and 327-R (left), 82-R and 628-R (middle) and 92-L and 851-L (right)). In each case, these 2 foci were observed in the wild type strain, and in a strain with an ectopic *parS* ($\Delta parS1234 parS +327$ (left), $\Delta parS1234 parS +552$ (middle) and $\Delta parS1234 parS -898$ (right)). Standard numbers indicate the percentage of each category among cells containing foci (the percentage of cells with no focus is indicated below). Numbers of cell considered are indicated. Schematics of the different chromosomal loci observed are represented above each column; the position of the displaced *parS* site is indicated in grey (in the wild type strain, *parS* sites are within 20 kb from *oriC*). Strains IVGB292, IVGB168 and IVGB173 were used for the wild type background, as well as strains IVGB478 ($\Delta parS1234 parS +347$ background), VLB140 ($\Delta parS1234 parS +552$ background) and IVGB510 ($\Delta parS1234 parS -898$ background).
(TIF)

S1 Table. Chromatin Immunoprecipitation of ParB-3xFLAG. Precise coordinates of each peak identified after the peak calling procedure, in each genetic background. Corresponding coordinates on the sequenced PAO1 strain from (Stover et al., 2000) are also indicated for clarity purpose. Grey area indicates the *parS* encompassing region of enrichment. The blue area refers to *dnaA* peak. Italicized letters and grey stars refer to peak numbers as indicated in [Figs 1 and S2](#).
(DOCX)

S2 Table. Foci number repartition in pPSV38-NGFP-ParB containing strains. % indicates the percentage of each category among the whole population of cells, whereas italicized numbers between brackets indicate the percentage of each category among cells containing foci. Numbers of cells considered are indicated below.
(DOCX)

S3 Table. Strains used in this study.
(DOCX)

S4 Table. Oligos used in this study.
(DOCX)

S1 Text. Supporting Materials and Methods.
(DOCX)

Acknowledgments

We thank L. Le Chat and F-X. Barre for sharing Matlab functions, V. Liroy for help with high-throughput sequencing analysis, and past and present members of the Boccard laboratory for insightful discussions. We are also grateful to B. Michel, Y. Yamaichi, J-L. Ferat and S. Duigou

for their valuable comments on the manuscript. We thank the IMAGIF genomic facility for high-throughput sequencing.

Author Contributions

Conceptualization: IVG FB.

Funding acquisition: FB.

Investigation: VL IVG.

Methodology: IVG VL.

Supervision: IVG FB.

Validation: VL IVG.

Visualization: IVG.

Writing – original draft: IVG.

Writing – review & editing: IVG FB.

References

1. Lemon KP, Grossman AD (2001) The extrusion-capture model for chromosome partitioning in bacteria. *Genes Dev* 15: 2031–2041. doi: [10.1101/gad.913301](https://doi.org/10.1101/gad.913301) PMID: [11511534](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11511534/)
2. Fisher JK, Bourniquel A, Witz G, Weiner B, Prentiss M, et al. (2013) Four-dimensional imaging of *E. coli* nucleoid organization and dynamics in living cells. *Cell* 153: 882–895. doi: [10.1016/j.cell.2013.04.006](https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.04.006) PMID: [23623305](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23623305/)
3. Jun S, Wright A (2010) Entropy as the driver of chromosome segregation. *Nat Rev Microbiol* 8: 600–607. doi: [10.1038/nrmicro2391](https://doi.org/10.1038/nrmicro2391) PMID: [20634810](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20634810/)
4. Kleckner N, Fisher JK, Stouf M, White MA, Bates D, et al. (2014) The bacterial nucleoid: nature, dynamics and sister segregation. *Curr Opin Microbiol* 22: 127–137. doi: [10.1016/j.mib.2014.10.001](https://doi.org/10.1016/j.mib.2014.10.001) PMID: [25460806](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25460806/)
5. Cobbe N, Heck MM (2004) The evolution of SMC proteins: phylogenetic analysis and structural implications. *Mol Biol Evol* 21: 332–347. doi: [10.1093/molbev/msh023](https://doi.org/10.1093/molbev/msh023) PMID: [14660695](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14660695/)
6. Livny J, Yamaichi Y, Waldor MK (2007) Distribution of centromere-like *parS* sites in bacteria: insights from comparative genomics. *J Bacteriol* 189: 8693–8703. doi: [10.1128/JB.01239-07](https://doi.org/10.1128/JB.01239-07) PMID: [17905987](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17905987/)
7. Mierzejewska J, Jagura-Burdzy G (2012) Prokaryotic ParA-ParB-*parS* system links bacterial chromosome segregation with the cell cycle. *Plasmid* 67: 1–14. doi: [10.1016/j.plasmid.2011.08.003](https://doi.org/10.1016/j.plasmid.2011.08.003) PMID: [21924286](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21924286/)
8. Vecchiarelli AG, Mizuuchi K, Funnell BE (2012) Surfing biological surfaces: exploiting the nucleoid for partition and transport in bacteria. *Mol Microbiol* 86: 513–523. doi: [10.1111/mmi.12017](https://doi.org/10.1111/mmi.12017) PMID: [22934804](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22934804/)
9. Lim HC, Surovtsev IV, Beltran BG, Huang F, Bewersdorf J, et al. (2014) Evidence for a DNA-relay mechanism in ParABS-mediated chromosome segregation. *Elife* 3: e02758. doi: [10.7554/eLife.02758](https://doi.org/10.7554/eLife.02758) PMID: [24859756](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24859756/)
10. Graham TG, Wang X, Song D, Etson CM, van Oijen AM, et al. (2014) ParB spreading requires DNA bridging. *Genes Dev* 28: 1228–1238. doi: [10.1101/gad.242206.114](https://doi.org/10.1101/gad.242206.114) PMID: [24829297](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24829297/)
11. Broedersz CP, Wang X, Meir Y, Loparo JJ, Rudner DZ, et al. (2014) Condensation and localization of the partitioning protein ParB on the bacterial chromosome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111: 8809–8814. doi: [10.1073/pnas.1402529111](https://doi.org/10.1073/pnas.1402529111) PMID: [24927534](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24927534/)
12. Sanchez A, Cattoni Diego I, Walter J-C, Rech J, Parmeggiani A, et al. Stochastic Self-Assembly of ParB Proteins Builds the Bacterial DNA Segregation Apparatus. *Cell Systems* 1: 163–173. doi: [10.1016/j.cels.2015.07.013](https://doi.org/10.1016/j.cels.2015.07.013) PMID: [27135801](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27135801/)
13. Taylor JA, Pastrana CL, Butterer A, Pernstich C, Gwynn EJ, et al. (2015) Specific and non-specific interactions of ParB with DNA: implications for chromosome segregation. *Nucleic Acids Res* 43: 719–731. doi: [10.1093/nar/gku1295](https://doi.org/10.1093/nar/gku1295) PMID: [25572315](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25572315/)

14. 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. doi: [10.1016/j.cell.2009.04.044](https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.04.044) PMID: [19450517](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19450517/)
15. 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. doi: [10.1016/j.cell.2009.02.035](https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.02.035) PMID: [19450516](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19450516/)
16. Minnen A, Attaiech L, Thon M, Gruber S, Veening JW (2011) SMC is recruited to *oriC* by ParB and promotes chromosome segregation in *Streptococcus pneumoniae*. *Mol Microbiol* 81: 676–688. doi: [10.1111/j.1365-2958.2011.07722.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2011.07722.x) PMID: [21651626](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21651626/)
17. Wang X, Le TB, Lajoie BR, Dekker J, Laub MT, et al. (2015) Condensin promotes the juxtaposition of DNA flanking its loading site in *Bacillus subtilis*. *Genes Dev* 29: 1661–1675. doi: [10.1101/gad.265876.115](https://doi.org/10.1101/gad.265876.115) PMID: [26253537](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26253537/)
18. Minnen A, Burmann F, Wilhelm L, Anchiuk A, Diebold-Durand ML, et al. (2016) Control of SMC Coiled Coil Architecture by the ATPase Heads Facilitates Targeting to Chromosomal ParB/*parS* and Release onto Flanking DNA. *Cell Rep* 14: 2003–2016. doi: [10.1016/j.celrep.2016.01.066](https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.01.066) PMID: [26904953](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26904953/)
19. Stover CK, Pham XQ, Erwin AL, Mizoguchi SD, Warrener P, et al. (2000) Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature* 406: 959–964. doi: [10.1038/35023079](https://doi.org/10.1038/35023079) PMID: [10984043](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10984043/)
20. Silby MW, Winstanley C, Godfrey SA, Levy SB, Jackson RW (2011) *Pseudomonas* genomes: diverse and adaptable. *FEMS Microbiol Rev* 35: 652–680. doi: [10.1111/j.1574-6976.2011.00269.x](https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2011.00269.x) PMID: [21361996](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21361996/)
21. Bartosik AA, Lasocki K, Mierzejewska J, Thomas CM, Jagura-Burdzy G (2004) ParB of *Pseudomonas aeruginosa*: interactions with its partner ParA and its target *parS* and specific effects on bacterial growth. *J Bacteriol* 186: 6983–6998. doi: [10.1128/JB.186.20.6983-6998.2004](https://doi.org/10.1128/JB.186.20.6983-6998.2004) PMID: [15466051](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15466051/)
22. Bartosik AA, Mierzejewska J, Thomas CM, Jagura-Burdzy G (2009) ParB deficiency in *Pseudomonas aeruginosa* destabilizes the partner protein ParA and affects a variety of physiological parameters. *Microbiology* 155: 1080–1092. doi: [10.1099/mic.0.024661-0](https://doi.org/10.1099/mic.0.024661-0) PMID: [19332810](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19332810/)
23. Kusiak M, Gapczynska A, Plochocka D, Thomas CM, Jagura-Burdzy G (2011) Binding and spreading of ParB on DNA determine its biological function in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 193: 3342–3355. doi: [10.1128/JB.00328-11](https://doi.org/10.1128/JB.00328-11) PMID: [21531806](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21531806/)
24. Lasocki K, Bartosik AA, Mierzejewska J, Thomas CM, Jagura-Burdzy G (2007) Deletion of the *parA* (*soj*) homologue in *Pseudomonas aeruginosa* causes ParB instability and affects growth rate, chromosome segregation, and motility. *J Bacteriol* 189: 5762–5772. doi: [10.1128/JB.00371-07](https://doi.org/10.1128/JB.00371-07) PMID: [17545287](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17545287/)
25. Petrusenko ZM, She W, Rybenkov VV (2011) A new family of bacterial condensins. *Mol Microbiol* 81: 881–896. doi: [10.1111/j.1365-2958.2011.07763.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2011.07763.x) PMID: [21752107](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21752107/)
26. Vallet-Gely I, Bocard F (2013) Chromosomal organization and segregation in *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS Genet* 9: e1003492. doi: [10.1371/journal.pgen.1003492](https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003492) PMID: [23658532](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23658532/)
27. Jecz P, Bartosik AA, Glabski K, Jagura-Burdzy G (2015) A single *parS* sequence from the cluster of four sites closest to *oriC* is necessary and sufficient for proper chromosome segregation in *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS One* 10: e0120867. doi: [10.1371/journal.pone.0120867](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0120867) PMID: [25794281](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25794281/)
28. Goldman SR, Sharp JS, Vvedenskaya IO, Livny J, Dove SL, et al. (2011) NanoRNAs prime transcription initiation *in vivo*. *Mol Cell* 42: 817–825. doi: [10.1016/j.molcel.2011.06.005](https://doi.org/10.1016/j.molcel.2011.06.005) PMID: [21700226](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21700226/)
29. Chiang SL, Rubin EJ (2002) Construction of a mariner-based transposon for epitope-tagging and genomic targeting. *Gene* 296: 179–185. PMID: [12383515](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12383515/)
30. Chao MC, Pritchard JR, Zhang YJ, Rubin EJ, Livny J, et al. (2013) High-resolution definition of the *Vibrio cholerae* essential gene set with hidden Markov model-based analyses of transposon-insertion sequencing data. *Nucleic Acids Res* 41: 9033–9048. doi: [10.1093/nar/gkt654](https://doi.org/10.1093/nar/gkt654) PMID: [23901011](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23901011/)
31. Valens M, Penaud S, Rossignol M, Cornet F, Bocard F (2004) Macrod domain organization of the *Escherichia coli* chromosome. *EMBO J* 23: 4330–4341. doi: [10.1038/sj.emboj.7600434](https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600434) PMID: [15470498](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15470498/)
32. Murray H, Errington J (2008) Dynamic control of the DNA replication initiation protein DnaA by Soj/ParA. *Cell* 135: 74–84. doi: [10.1016/j.cell.2008.07.044](https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.07.044) PMID: [18854156](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18854156/)
33. Klockgether J, Munder A, Neugebauer J, Davenport CF, Stanke F, et al. (2010) Genome diversity of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 laboratory strains. *J Bacteriol* 192: 1113–1121. doi: [10.1128/JB.01515-09](https://doi.org/10.1128/JB.01515-09) PMID: [20023018](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20023018/)

34. Umbarger MA, Toro E, Wright MA, Porreca GJ, Bau D, et al. (2011) The three-dimensional architecture of a bacterial genome and its alteration by genetic perturbation. *Mol Cell* 44: 252–264. doi: [10.1016/j.molcel.2011.09.010](https://doi.org/10.1016/j.molcel.2011.09.010) PMID: [22017872](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22017872/)
35. David A, Demarre G, Muresan L, Paly E, Barre FX, et al. (2014) The two Cis-acting sites, *parS1* and *oriC1*, contribute to the longitudinal organisation of *Vibrio cholerae* chromosome I. *PLoS Genet* 10: e1004448. doi: [10.1371/journal.pgen.1004448](https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004448) PMID: [25010199](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25010199/)
36. Bowman GR, Comolli LR, Zhu J, Eckart M, Koenig M, et al. (2008) A polymeric protein anchors the chromosomal origin/ParB complex at a bacterial cell pole. *Cell* 134: 945–955. doi: [10.1016/j.cell.2008.07.015](https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.07.015) PMID: [18805088](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18805088/)
37. Ebersbach G, Briegel A, Jensen GJ, Jacobs-Wagner C (2008) A self-associating protein critical for chromosome attachment, division, and polar organization in *Caulobacter*. *Cell* 134: 956–968. doi: [10.1016/j.cell.2008.07.016](https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.07.016) PMID: [18805089](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18805089/)
38. Yamaichi Y, Bruckner R, Ringgaard S, Moll A, Cameron DE, et al. (2012) A multidomain hub anchors the chromosome segregation and chemotactic machinery to the bacterial pole. *Genes Dev* 26: 2348–2360. doi: [10.1101/gad.199869.112](https://doi.org/10.1101/gad.199869.112) PMID: [23070816](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23070816/)
39. Lee PS, Lin DC, Moriya S, Grossman AD (2003) Effects of the chromosome partitioning protein SpoIJ (ParB) on *oriC* positioning and replication initiation in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* 185: 1326–1337. doi: [10.1128/JB.185.4.1326-1337.2003](https://doi.org/10.1128/JB.185.4.1326-1337.2003) PMID: [12562803](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12562803/)
40. Harms A, Treuner-Lange A, Schumacher D, Sogaard-Andersen L (2013) Tracking of chromosome and replisome dynamics in *Myxococcus xanthus* reveals a novel chromosome arrangement. *PLoS Genet* 9: e1003802.
41. Toro E, Hong SH, McAdams HH, Shapiro L (2008) *Caulobacter* requires a dedicated mechanism to initiate chromosome segregation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 15435–15440. doi: [10.1073/pnas.0807448105](https://doi.org/10.1073/pnas.0807448105) PMID: [18824683](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18824683/)
42. Wang X, Tang OW, Riley EP, Rudner DZ (2014) The SMC condensin complex is required for origin segregation in *Bacillus subtilis*. *Curr Biol* 24: 287–292. doi: [10.1016/j.cub.2013.11.050](https://doi.org/10.1016/j.cub.2013.11.050) PMID: [24440393](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24440393/)
43. Gruber S, Veening JW, Bach J, Blettinger M, Bramkamp M, et al. (2014) Interlinked sister chromosomes arise in the absence of condensin during fast replication in *B. subtilis*. *Curr Biol* 24: 293–298. doi: [10.1016/j.cub.2013.12.049](https://doi.org/10.1016/j.cub.2013.12.049) PMID: [24440399](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24440399/)
44. Le TB, Laub MT (2016) Transcription rate and transcript length drive formation of chromosomal interaction domain boundaries. *EMBO J* 35: 1582–1595. doi: [10.15252/embj.201593561](https://doi.org/10.15252/embj.201593561) PMID: [27288403](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27288403/)
45. Endesfelder U, Finan K, Holden SJ, Cook PR, Kapanidis AN, et al. (2013) Multiscale spatial organization of RNA polymerase in *Escherichia coli*. *Biophys J* 105: 172–181. doi: [10.1016/j.bpj.2013.05.048](https://doi.org/10.1016/j.bpj.2013.05.048) PMID: [23823236](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23823236/)
46. Demarre G, Guerout AM, Matsumoto-Mashimo C, Rowe-Magnus DA, Marliere P, et al. (2005) A new family of mobilizable suicide plasmids based on broad host range R388 plasmid (IncW) and RP4 plasmid (IncPalpha) conjugative machineries and their cognate *Escherichia coli* host strains. *Res Microbiol* 156: 245–255. doi: [10.1016/j.resmic.2004.09.007](https://doi.org/10.1016/j.resmic.2004.09.007) PMID: [15748991](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15748991/)
47. Ferrieres L, Hemery G, Nham T, Guerout AM, Mazel D, et al. (2010) Silent mischief: bacteriophage Mu insertions contaminate products of *Escherichia coli* random mutagenesis performed using suicidal transposon delivery plasmids mobilized by broad-host-range RP4 conjugative machinery. *J Bacteriol* 192: 6418–6427. doi: [10.1128/JB.00621-10](https://doi.org/10.1128/JB.00621-10) PMID: [20935093](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20935093/)
48. Sliusarenko O, Heinritz J, Emonet T, Jacobs-Wagner C (2011) High-throughput, subpixel precision analysis of bacterial morphogenesis and intracellular spatio-temporal dynamics. *Mol Microbiol* 80: 612–627. doi: [10.1111/j.1365-2958.2011.07579.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2011.07579.x) PMID: [21414037](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21414037/)
49. El Sayyed H, Le Chat L, Lebailly E, Vickridge E, Pages C, et al. (2016) Mapping Topoisomerase IV Binding and Activity Sites on the *E. coli* Genome. *PLoS Genet* 12: e1006025. doi: [10.1371/journal.pgen.1006025](https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1006025) PMID: [27171414](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27171414/)
50. Rietsch A, Vallet-Gely I, Dove SL, Mekalanos JJ (2005) ExsE, a secreted regulator of type III secretion genes in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 8006–8011. doi: [10.1073/pnas.0503005102](https://doi.org/10.1073/pnas.0503005102) PMID: [15911752](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15911752/)
51. Kulasekara HD (2014) Transposon mutagenesis. *Methods Mol Biol* 1149: 501–519. doi: [10.1007/978-1-4939-0473-0_39](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0473-0_39) PMID: [24818929](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24818929/)

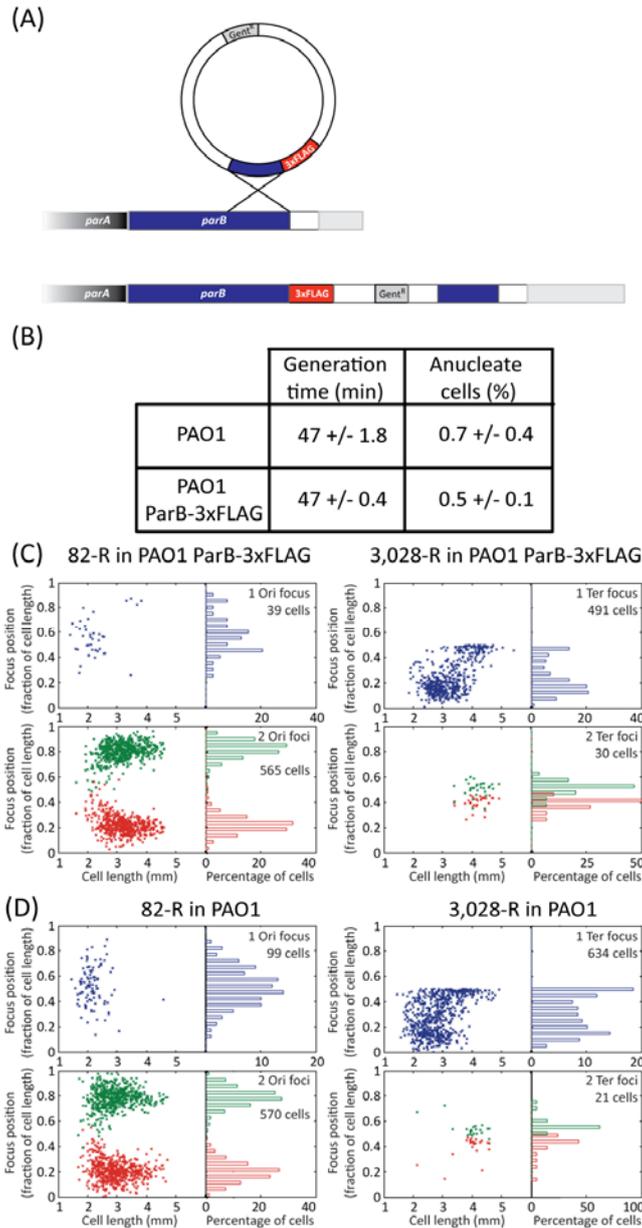


Figure S1 : Construction of a functional ParB-3xFLAG fusion.

(A) Schematic representation of the 3xFLAG tag integration vector and its use to construct the PAO1 ParB-3xFLAG strain that synthesizes the ParB protein with a 3xFLAG tag (ParB-3xFLAG) at native levels. (B) Generation times and amounts of anucleate cells of the PAO1 wild type strain and the PAO1 ParB-3xFLAG derivative (Strain IVGB379) (C) Positioning of chromosomal loci located in the Ori region (82-R, left panels) and in the Ter region (3,028-R, right panels) in the PAO1 ParB-3xFLAG and (D) in the PAO1 strains grown in minimal medium supplemented with citrate (respectively strains IVGB396, IVGB397 and IVGB123). The position of the foci in cells containing 1 (upper panels) or 2 (bottom panels) foci are presented. Both loci were visualized individually. Cells for the Ori locus were randomly oriented, whereas cells for the Ter locus were arbitrarily oriented to have foci closer to the 0 pole.

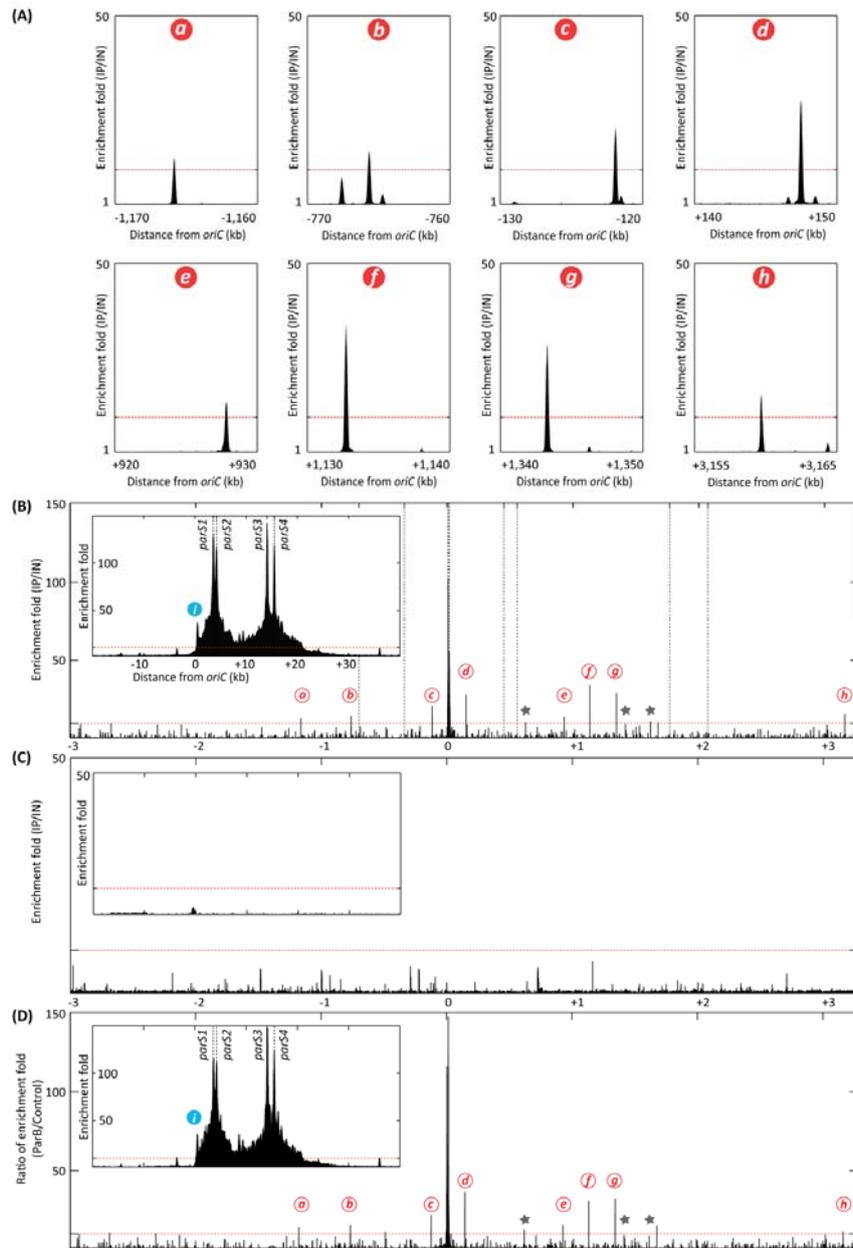


Figure S2

A) Each panel represents a zoom of Fig 1A, of each 10 kb region containing a secondary peak identified in the wild type background. Letters refer to Fig 1 and S1 Table. The red dotted line indicates the 10 fold enrichment limit. (B) Chromatin Immunoprecipitation using an anti-3xFLAG antibody in the PAO1 ParB-3xFLAG strain (Strain IVGB379) or (C) in the PAO1 strain. Enrichment folds between the immunoprecipitated (IP) and the input (IN) fractions are represented for each base of the genome, according to its distance from *oriC*, and ratio of these enrichment folds are represented in (D). The insets represent a zoom of the region containing the four *parS* sites bound by ParB. Dashed vertical lines represent the position of the proposed *parS* sites from [21]. Red italicized letters indicated ParB accessory binding sites, and blue italicized letters represents the promoter region of *dnaA*. Grey stars indicate peaks that are less prominent but still found in the different genetic backgrounds. The red dotted lines indicate the significant enrichment.

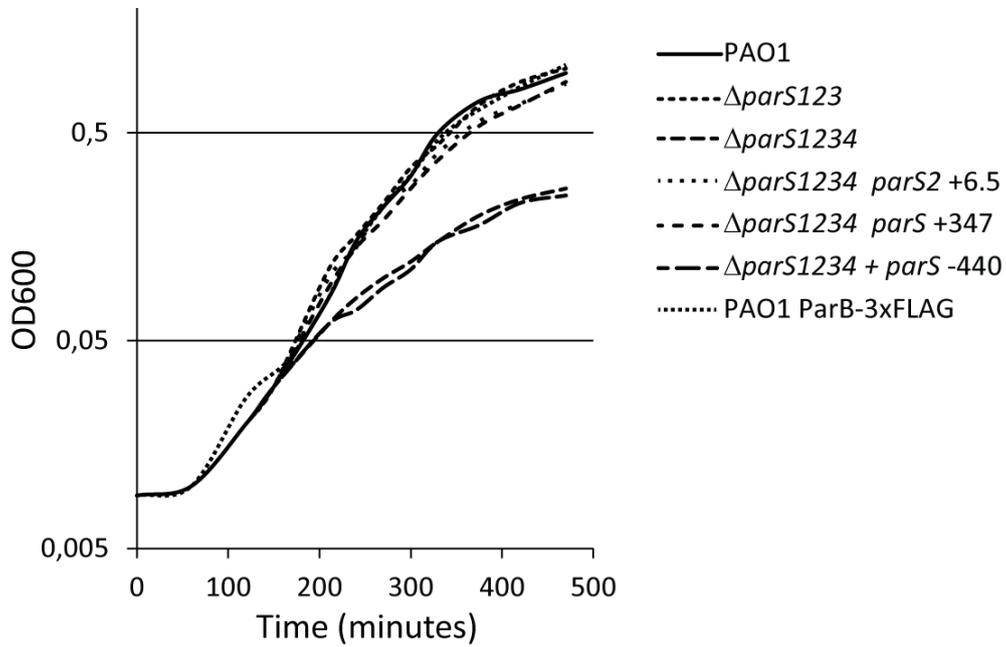


Figure S3

OD600 was measured during growth in Minimal Medium supplemented with Glucose and Casamino Acids, and plotted in logarithmic scale according to time. Growth curves for strains PAO1, PAO1 ParB-3xFLAG (IVGB379), $\Delta parS123$ (IVGB469), $\Delta parS1234$ (VLB1), $\Delta parS1234 \ parS2 +6.5$ (VLB63), $\Delta parS1234 \ parS +347$ (VLB66) and $\Delta parS1234 \ parS -440$ (VLB70) are represented.

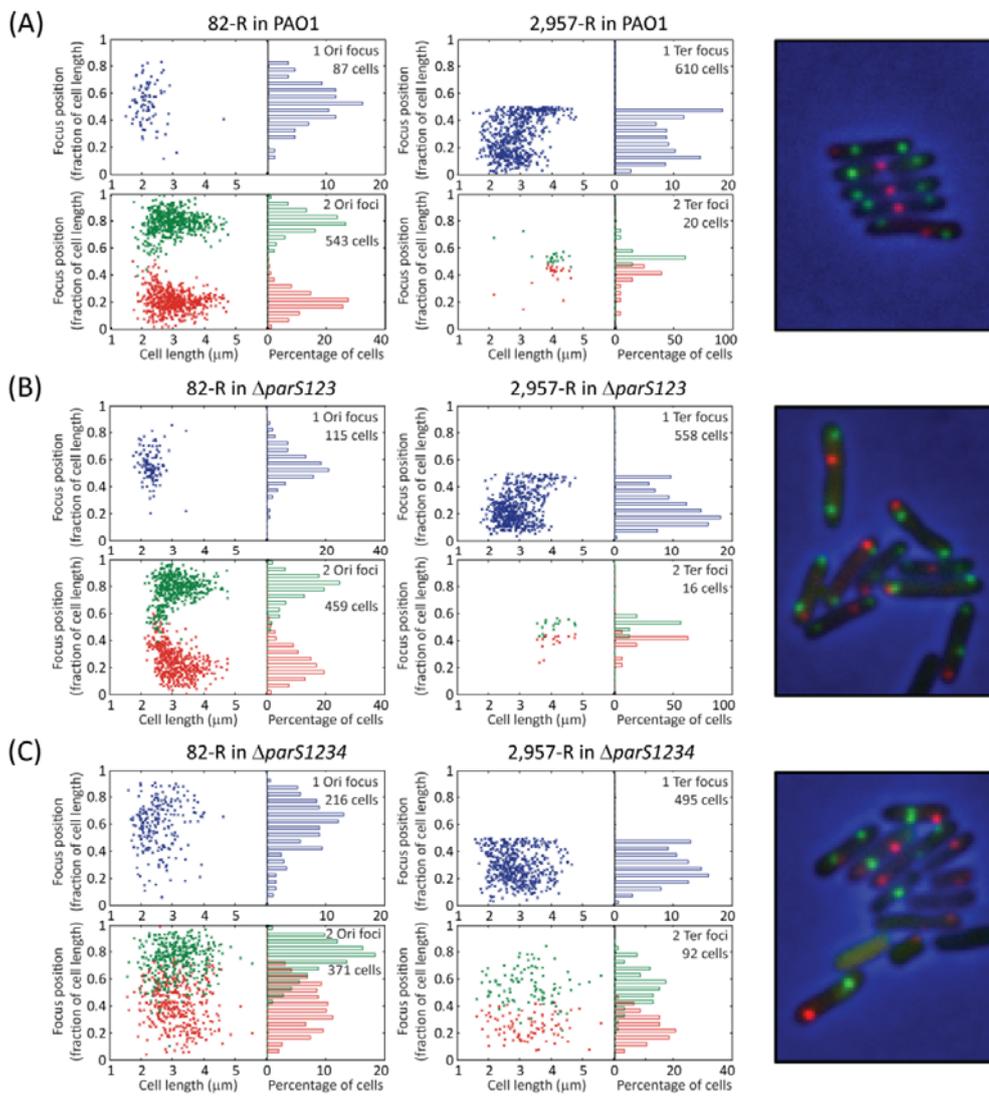


Figure S4

Positioning of chromosomal loci located in the Ori region (82-R, left panels) and in the Ter region (2,957-R, right panels) in the wild type PAO1 strain **(A)** the $\Delta pars123$ mutant **(B)** and the $\Delta pars1234$ mutant **(C)** grown in minimal medium supplemented with citrate. The position of the foci in cells containing 1 (upper panels) or 2 (bottom panels) foci are presented. Both loci were visualized in the same cells (using strains IVGB123, VLB13 and VLB21 respectively), which were oriented relative to the Ter locus position (the pole closest to this locus was assumed to be the new pole of the cell). Representative images are shown on the right. The Ori locus is represented in green, and the Ter one in red.

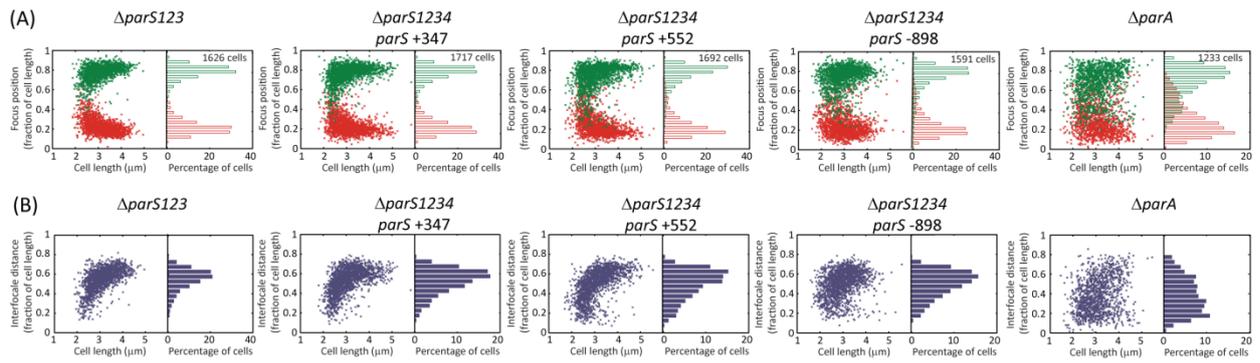


Figure S5

The pPSV38-NGFP-ParB plasmid was introduced in different strains, and NGFP-ParB localization was observed in cells grown in minimal medium supplemented with citrate. Foci numbers for each strain are indicated in S2 Table. (A) represents the localization of the 2 foci in cells (randomly oriented) containing two foci, for each genetic background, whereas (B) represents the distance between the two foci. Strains IVGB469 ($\Delta parS123$), VLB66 ($\Delta parS1234 parS +347$), IVGB480 ($\Delta parS1234 parS +552$), VLB69 ($\Delta parS1234 parS -898$) and IVGB317 ($\Delta parA$) were used.

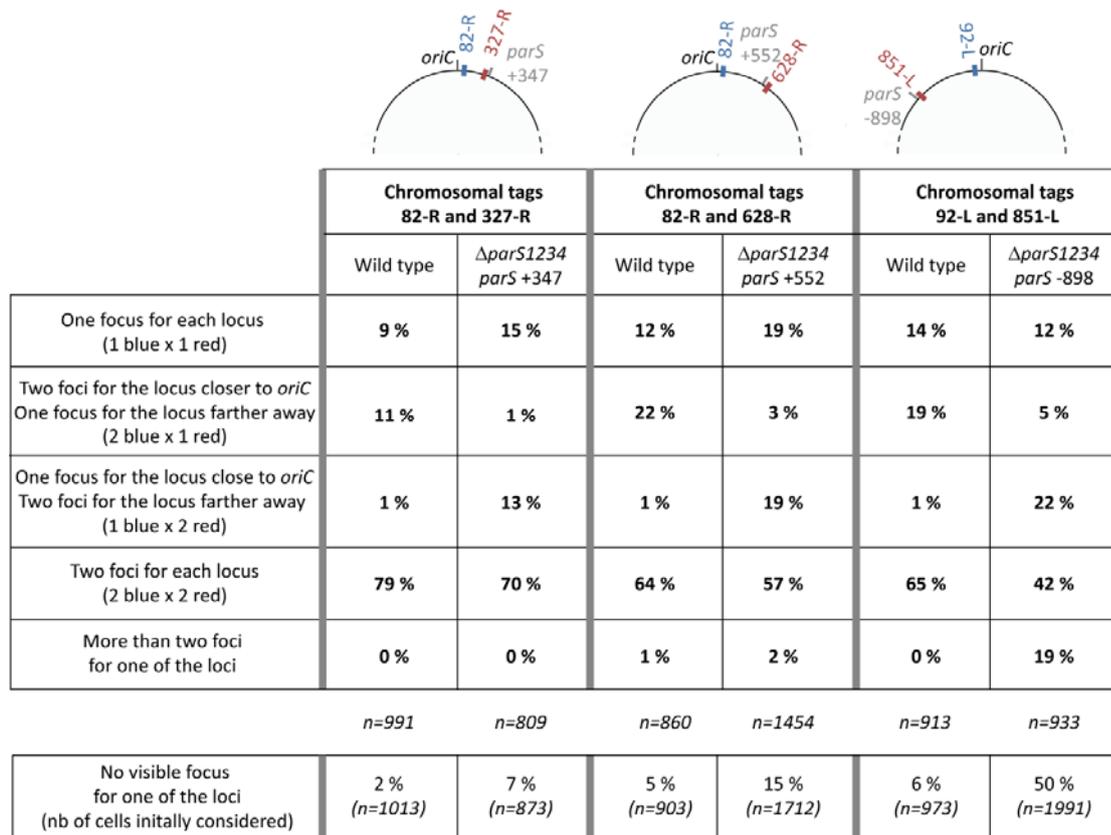


Figure S6

In each case, these 2 foci were observed in the wild type strain, and in a strain with an ectopic *parS* ($\Delta parS1234$ *parS* +327 (left), $\Delta parS1234$ *parS* +552 (middle) and $\Delta parS1234$ *parS* -898 (right)). Standard numbers indicate the percentage of each category among cells containing foci (the percentage of cells with no focus is indicated below). Numbers of cell considered are indicated. Schematics of the different chromosomal loci observed are represented above each column; the position of the displaced *parS* site is indicated in grey (in the wild type strain, *parS* sites are within 20 kb from *oriC*). Strains IVGB292, IVGB168 and IVGB173 were used for the wild type background, as well as strains IVGB478 ($\Delta parS1234$ *parS* +347 background), VLB140 ($\Delta parS1234$ *parS* +552 background) and IVGB510 ($\Delta parS1234$ *parS* -898 background)

S1 Text

Supporting Materials and Methods

Plasmids and Strains constructions

Escherichia coli DH5alpha (Invitrogen) was used as the recipient strain for all plasmid constructions, whereas *E. coli* strain β 2163 [1] was used to mate plasmids into *P. aeruginosa*.

All the integration vectors carry the mobilization region from RP4, the ColE1 origin of replication and the *aacC1* gene (conferring resistance to gentamicin). Plasmids derived from the pP30D-FRT-eGFP [2] also contain FRT sites for efficient Flp recombinase-mediated excision. Plasmids derived from the pEXG2 [3] also contain the *sacB* gene for allelic exchange.

Plasmids allowing insertion of chromosomal tags and their visualization using fluorescent proteins have been described previously [2].

In order to replace the chromosomal gene encoding ParB (PA5562), by a gene encoding a 3xFLAG tagged version of this protein, we engineered plasmid pP30D-FRT-ParB-3xFLAG. Using PCR, we add the sequence encoding the 3xFLAG to the 3' portion of the *parB* gene, and cloned this fragment into *HindIII/BamHI* cut pP30D-FRT-eGFP. Strains PAO1 ParB-3xFLAG, *DparS123* ParB-3xFLAG and *DparS1234* ParB-3xFLAG were constructed by mating PAO1, Δ *parS123* and Δ *parS1234* with β 2163 containing pP30D-FRT-ParB-3xFLAG and selected on *Pseudomonas* isolation agar (PIA) (Difco) containing gentamicin (60 μ g/ml) as previously described [2]. The plasmid backbone was excised from the PAO1 ParB-3xFLAG through transient synthesis of FLP recombinase from plasmid pFLP2 [4]. Resulting strains were then mated with β 2163 containing the pP30D-FRT-*parST1*-PA2258 and pP30D-FRT-*parST1*-PA0069 plasmids, and transformants were once again selected on PIA containing Gentamicin. In order to visualize the chromosomal tags, plasmid pPSV35Ap-TetR-Cfp-yGfp-ParBT1 was introduced by electroporation, and transformants selected on LB supplemented with Carbenicillin (300 μ g/ml).

In order to inactivate *parS* sites, we engineered plasmids pEXG2 Δ *parS1*, pEXG2 Δ *parS2*, pEXG2 Δ *parS3* and pEXG2 Δ *parS4* by amplifying flanking regions by the PCR and then splicing the flanking regions together by overlap extension PCR. Silent points mutations were introduced in *parS1* and *parS2*: the *parS1* sequence was changed into TTTTTCATGTTGAGCC, and the *parS2* sequence was changed into TGTTCATGTTGAGCA. The *parS3* and *parS4* sites were replaced by the 6-bp linker sequence 5'-GAATTC-3'. Deletions were confirmed by PCR and sequencing.

Plasmid pP30D-FRT-*parSP1* was engineered by cloning approximately 150 pb containing the *parSP1* site from pGBKD3*parS* [5] on a *HindIII/BamHI* fragment into pP30D-FRT-eGFP. This fragment

was amplified by PCR and *KpnI* and *NotI* sites were also introduced upstream of *parSP1*, as well as a *EcoRI* site downstream of *parSP1*. Next, we replaced the *PstI/EcoRI* fragment containing the *parSP1* site with approximately 150 pb containing *parS2* and *parS9* from PAO1, resulting into the pP30D-FRT-*parS2* and pP30D-FRT-*parS9* plasmids. Approximately 500 bp of intergenic region were then cloned into these plasmids, giving rise to pP30D-FRT-*parS2*-PA0004, pP30D-FRT-*parS9*-PA0004, pP30D-FRT-*parS2*-PA0306, pP30D-FRT-*parS2*-PA0500, pP30D-FRT-*parS2*-PA4778 and pP30D-FRT-*parS2*-PA5170. These plasmids were transformed into β 2163 and mated with the Δ *parS1234* mutant, and transformants were selected on PIA supplemented with gentamicin, resulting in strains Δ *parS1234 parS2* +6.5, Δ *parS1234 parS9* +6.5, Δ *parS1234 parS* +347, Δ *parS1234 parS* +545, Δ *parS1234 parS* -898 and Δ *parS1234 parS* -330 respectively. Strains Δ *parS1234 parS* +449, Δ *parS1234 parS* +552 and Δ *parS1234 parS* -330 were generated by allelic exchange resulting in the replacement of the putative *parS5*, *parS6* and *parS10* sequences from [6] with the *parS3* sequence, using the pEXG2 Δ *parS5-parS3*, pEXG2 Δ *parS6-parS3* and pEXG2 Δ *parS10-parS3* plasmids.

The deletion construct for the *rrnD* was generated by amplifying flanking regions by the PCR and then splicing the flanking regions together by overlap extension PCR, replacing the *rrnD* operon by a 6-bp linker sequence 5'-GAATTC-3'. The resulting PCR products were cloned on *XbaI/HindIII* fragments into plasmid pEXG2, yielding plasmid pEXM Δ *rrnD*. This plasmid was then used to create strains Δ *parS1234 parS* -330 Δ *rrnD* and Δ *parS1234 parS* -998 Δ *rrnD* by allelic exchange. Deletions were confirmed by the PCR.

The pP30D-FRT-*attL* plasmid was engineered by cloning the 5' part of *lacZ* fused to the *attL* site from plasmid pG6i [7] in the *NotI/BamHI* cut pP30D-FRT-eGFP. The *SalI* fragment containing 5'*lacZ* and *attL* was then replaced by the *SalI* fragment from plasmid pG6i containing the *attR* site fused to the 3' part of *lacZ*, resulting in plasmid pP30D-FRT-*attR*. The 500 pb of intergenic region from pP30D-FRT-tetO-PA4822 [2] were cloned in the reverse orientation into the pP30D-FRT-*attL* plasmid, resulting in plasmid pP30D-FRT-*attL*-PA4822. Then, 150 bp containing the *parS3* sequence were cloned into the *HindIII* cut pP30D-FRT-*attL*-PA4822, resulting in plasmid pP30D-FRT-*parS-attL*-PA4822. The pP30D-FRT-*attL-parS*-PA0572 plasmid was obtained by cloning the intergenic region from pP30D-FRT-tetO-PA0572 [2] in the reverse orientation into the pP30D-FRT-*attR*, and by cloning 150 bp containing the *parS3* sequence into the resulting pP30D-FRT-*attL*-PA0572 cut by *KpnI*. The Δ *parS1234* mutant was then mated with β 2163 containing these two plasmids, and transformants were once again selected on PIA containing Gentamicin. The plasmid backbone was excised as described above, resulting in strains *parS attL* 851-L and *parS attL* 628-R respectively. Plasmids pP30D-FRT-*attR*-PA0069, pP30D-FRT-*attR*-PA0290 and pP30D-FRT-*attR*-PA5490 (resulting from the cloning of the intergenic regions from pP30D-FRT-tetO-PA0069, pP30D-FRT-tetO-PA0290 and pP30D-

FRT-tetO-PA5480 [2] into the pP30D-FRT-*attR*) were then transformed into β 2163 and mated with *parS attL* 851-L and *parS attL* 628-R. Transformants were selected on Gentamicin, resulting in strains *parS attL* 851-L *attR* 82-R, *parS attL* 851-L *attR* 327-R, *parS attL* 851-L *attR* 92-L, *parS attL* 628-R *attR* 82-R, *parS attL* 628-R *attR* 327-R and *parS attL* 628-R *attR* 92-L respectively.

The pCXIPA was engineered by cloning the *int* and *xis* gene from plasmid pTSA-CXI [7] on a PCR amplified *Bgl*II/*Sac*I fragment into the pFLP2 [4] cut with *Bam*HI/*Sac*I. This plasmid was then electroporated into the *attL attR* containing strains. Blue colonies were the one in which a recombination between *attL* and *attR* upon Int and Xis action lead to the reconstitution of a functional *lacZ* gene (containing a *attB* site in frame), and inversion of the region between *attL* and *attR*. For more details, see [7]. The pCXIPA was then counterselected on sucrose. This allowed us to generate strains *parS attL* 851-L *attR* 82-R INVERTED, *parS attL* 851-L *attR* 327-R INVERTED, *parS attL* 851-L *attR* 92-L INVERTED, *parS attL* 628-R *attR* 82-R INVERTED, *parS attL* 628-R *attR* 327-R INVERTED and *parS attL* 628-R *attR* 92-L INVERTED.

The pPSV38-NGFP plasmid was engineered by cloning the PCR amplified eGFP encoding gene (from pP30D-FRT-eGFP, which originate from the pGBM2*kan-gfp* plasmid [8]) in the EcoRI/KpnI cut pPSV38-sspB [9]. A Shine-Dalgarno sequence was added upstream of the ATG, and a NotI site was added downstream of the eGFP encoding gene, allowing in frame fusion. The *parB* gene was then cloned in frame into the NotI/HindIII cut pPSV38-NGFP plasmid, resulting in the pPSV38-NGFP-ParB. Functionality of this GFP-ParB construct was tested by introducing the plasmid into a Δ *parB* mutant and assessing its ability to complement its growth defect.

Oligos are listed in S4 Table and plasmid sequences are available on request.

Supplemental references

1. Demarre G, Guerout AM, Matsumoto-Mashimo C, Rowe-Magnus DA, Marliere P, et al. (2005) A new family of mobilizable suicide plasmids based on broad host range R388 plasmid (IncW) and RP4 plasmid (IncPalph) conjugative machineries and their cognate Escherichia coli host strains. Res Microbiol 156: 245-255.
2. Vallet-Gely I, Boccard F (2013) Chromosomal organization and segregation in Pseudomonas aeruginosa. PLoS Genet 9: e1003492.
3. Rietsch A, Vallet-Gely I, Dove SL, Mekalanos JJ (2005) ExsE, a secreted regulator of type III secretion genes in Pseudomonas aeruginosa. Proc Natl Acad Sci U S A 102: 8006-8011.
4. Hoang TT, Karkhoff-Schweizer RR, Kutchma AJ, Schweizer HP (1998) A broad-host-range Flp-FRT recombination system for site-specific excision of chromosomally-located DNA sequences: application for isolation of unmarked Pseudomonas aeruginosa mutants. Gene 212: 77-86.

5. Espeli O, Mercier R, Boccard F (2008) DNA dynamics vary according to macrodomain topography in the *E. coli* chromosome. *Mol Microbiol* 68: 1418-1427.
6. Bartosik AA, Lasocki K, Mierzejewska J, Thomas CM, Jagura-Burdzy G (2004) ParB of *Pseudomonas aeruginosa*: interactions with its partner ParA and its target parS and specific effects on bacterial growth. *J Bacteriol* 186: 6983-6998.
7. Valens M, Penaud S, Rossignol M, Cornet F, Boccard F (2004) Macrodomain organization of the *Escherichia coli* chromosome. *EMBO J* 23: 4330-4341.
8. Espeli O, Nurse P, Levine C, Lee C, Mariani KJ (2003) SetB: an integral membrane protein that affects chromosome segregation in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 50: 495-509.
9. Goldman SR, Sharp JS, Vvedenskaya IO, Livny J, Dove SL, et al. (2011) NanoRNAs prime transcription initiation in vivo. *Mol Cell* 42: 817-825.

Table S1 : Chromatin Immunoprecipitation of ParB-3xFLAG. Precise coordinates of each peak identified after the peak calling procedure, in each genetic background. Corresponding coordinates on the sequenced PAO1 strain from (Stover et al., 2000) are also indicated for clarity purpose. Grey area indicates the *parS* encompassing region of enrichment. The blue area refers to *dnaA* peak. Italicized letters and grey stars refer to peak numbers as indicated in Fig. 1 and S2.* indicates peaks overlapping intergenic regions.

PAO1 ParB-3xFLAG						
Peak number (from Figure 1)	Start (distance from <i>oriC</i> , bp)	End (distance from <i>oriC</i> , bp)	Size (bp)	Enrichment fold	Start (genome from {Stover, 2000 #48})	End (genome from {Stover, 2000 #48})
<i>a</i>	-1,176,965	-1,176,848	117	12	5,098,499	5,098,616
<i>b*</i>	-765,758	-765,590	168	13	5,498,646	5,498,814
<i>c</i>	-122,017	-121,790	227	16	6,142,387	6,142,614
<i>i</i>						
	245	21,030	20,785	33	245	21030
<i>d*</i>	147,324	147,612	288	20	147,324	147,612
★	620,830	620,876	46	10	620,830	620,876
<i>e</i>	929,279	929,439	160	12	4,586,549	4,586,389
<i>f</i>	1,134,090	1,134,389	299	23	4,381,738	4,381,439
<i>g</i>	1,344,675	1,344,936	261	21	4,171,153	4,170,892
★	1,416,134	1,416,359	225	8	4,099,694	4,099,469
★	1,676,434	1,676,469	35	10	3,839,394	3,839,359
<i>h</i>	3,161,136	3,161,279	143	14	2,354,692	2,354,549

Δ <i>parS123</i> ParB-3xFLAG				
Peak number (from Figure 1)	Start (distance from <i>oriC</i> , bp)	End (distance from <i>oriC</i> , bp)	Size (bp)	Enrichment fold
<i>a</i>	-1,176,968	-1,176,855	113	23
<i>b*</i>	-765,761	-765,598	163	24
<i>c</i>	-121,997	-121,787	210	30
<i>i</i>	385	607	222	29
	12,203	20,349	8,146	20
<i>d*</i>	147,328	147,615	287	38
★	620,797	620,915	118	17
<i>e</i>	929,330	929,450	120	25
<i>f</i>	1,134,092	1,134,389	297	45
<i>g</i>	1,344,682	1,344,947	265	40
★	1,416,192	1,416,268	76	22
★	1,676,523	1,676,543	20	15
<i>h</i>	3,161,129	3,161,287	158	27

Δ <i>parS1234</i> ParB-3xFLAG				
Peak number (from Figure 1)	Start (distance from <i>oriC</i> , bp)	End (distance from <i>oriC</i> , bp)	Size (bp)	Enrichment fold
<i>a</i>	-1,176,929	-1,176,887	42	23
<i>b*</i>	-765,723	-765,621	102	24
<i>c</i>	-122,005	-121,793	212	30
<i>i</i>	393	601	208	29
<i>d*</i>	147,331	147,597	266	18
★	620,744	620,947	203	7
<i>e</i>	929,330	929,450	120	25
<i>f</i>	1,134,108	1,134,370	262	45
<i>g</i>	1,344,681	1,344,935	254	40
★	1,416,190	1,416,308	118	22
★	1,676,337	1,676,542	205	6
<i>h</i>	3,161,139	3,161,270	131	27

Table S1: Strains used in this study

Strain number	Strain description	Ref
IVGB379	PAO1 ParB-3xFLAG	This study
IVGB396	PAO1 ParB-3xFLAG parST1-PA2258(3,028-R) + pPSV35Ap-TetR-Cfp-yGFP-ParBT1	This study
IVGB397	PAO1 ParB-3xFLAG parST1-PA0069(82-R) + pPSV35Ap-TetR-Cfp-yGFP-ParBT1	This study
IVGB469	Δ parS123	This study
VLB1	Δ parS1234	This study
VLB3	Δ parS123 + ParB-3xFLAG	This study
VLB4	Δ parS1234 ParB-3xFLAG	This study
IVGB123	PAO1 parST1-PA2319(2,957-R) tetO-PA0069(82-R) + pPSV35Ap-TetR-CFP-yGFP-ParBT1	[1]
VLB13	Δ parS123 parST1-PA2319(2,957-R) tetO-PA0069(82-R) + pPSV35Ap-TetR-CFP-yGFP-ParBT1	This study
VLB21	Δ parS1234 parST1-PA2319(2,957-R) tetO-PA0069(82-R) + pPSV35Ap-TetR-CFP-yGFP-ParBT1	This study
VLB63	Δ parS1234 parS2 +6.5	This study
VLB62	Δ parS1234 parS9 +6.5	This study
VLB69	Δ parS1234 parS -898	This study
VLB70	Δ parS1234 parS -440	This study
IVGB481	Δ parS1234 parS -330	This study
VLB66	Δ parS1234 parS +347	This study
IVGB479	Δ parS1234 parS +449	This study
VLB73	Δ parS1234 parS +545	This study
IVGB480	Δ parS1234 parS +552	This study
IVGB317	Δ parA	[1]
	Δ parS1234 PA0290(327-R) + pPSV35Ap-TetR-CFP-yGFP-ParBT1	This study
IVGB478	Δ parS1234 parS +347 (VLB66) parST1-PA0069(82-R) tetO-PA0290(327-R) + pPSV35Ap-TetR-CFP-yGFP-ParBT1	This study
VLB23	Δ parS1234 parST1-PA2319(2,957-R) tetO-PA0572(628-R) + pPSV35Ap-TetR-CFP-yGFP-ParBT1	This study
VLB140	Δ parS1234 parS +552 (IVGB480) parST1-PA0069(82-R) tetO-PA0572(628-R) + pPSV35Ap-TetR-CFP-yGFP-ParBT1	This study
IVGB509	Δ parS1234 parST1-PA5480(92-L) tetO-PA4822(851-L) + pPSV35Ap-TetR-CFP-yGFP-ParBT1	This study
IVGB510	Δ parS1234 parS -898 (VLB69) parST1-PA5480(92-L) tetO-PA4822(851-L) + pPSV35Ap-TetR-CFP-yGFP-ParBT1	This study
IVGB292	PAO1parST1-PA0069(82-R) tetO-PA0290(327-R) + pPSV35Ap-TetR-CFP-yGFP-ParBT1	This study
IVGB168	PAO1parST1-PA0069(82-R) tetO-PA0572(628-R) + pPSV35Ap-TetR-CFP-yGFP-ParBT1	This study
IVGB173	PAO1parST1-PA5480(92-L) tetO-PA4822(851-L) + pPSV35Ap-TetR-CFP-yGFP-ParBT1	This study
IVGB524	Δ parS1234 parS -330 Δ rrnD	This study
IVGB526	Δ parS1234 parS -898 Δ rrnD	This study
VLB271	Δ parS1234parS attL 851-L attR 82-R	This study
VLB272	Δ parS1234parS attL 851-L attR 327-R	This study
VLB273	Δ parS1234parS attL 851-L attR 92-L	This study
VLB276	Δ parS1234parS attL 851-L attR 82-R INVERTED	This study
VLB277	Δ parS1234parS attL 851-L attR 327-R INVERTED	This study
VLB278	Δ parS1234parS attL 851-L attR 92-L INVERTED	This study
IVGB556	Δ parS1234parS attL 628-R attR 82-R	This study
IVGB557	Δ parS1234parS attL 628-R attR 327-R	This study

IVGB558	$\Delta parS1234parS attL 628-R attR 92-L$	This study
VLB333	$\Delta parS1234parS attL 628-R attR 82-R$ INVERTED	This study
VLB334	$\Delta parS1234parS attL 628-R attR 327-R$ INVERTED	This study
VLB335	$\Delta parS1234 attL-parS-PA0572(628-R) attR-PA5480(92-L)$ INVERTED	This study

1. Vallet-Gely I, Boccard F (2013) Chromosomal organization and segregation in *Pseudomonas aeruginosa*. PLoS Genet 9: e1003492.

Table S2: Foci number repartition in pPSV38-NGFP-ParB containing strains. % indicates the percentage of each category among the whole population of cells, whereas italicized numbers between brackets indicate the percentage of each category among cells containing foci. Numbers of cells considered are indicated below.

	<i>ΔparS123</i>	<i>ΔparS1234 parS +347</i>	<i>ΔparS1234 parS +552</i>	<i>ΔparS1234 parS -898</i>	<i>ΔparA</i>
0 focus cells (%)	4 %	12 %	10 %	42 %	31 %
1 focus cells (%)	4 % (4)	13 % (15)	16 % (18)	14 % (24)	11 % (16)
2 foci cells (%)	90 % (94)	73 % (83)	72 % (80)	40 % (69)	48 % (68)
>2 foci cells (%)	2 % (2)	2 % (2)	2 % (2)	4 % (7)	11 % (16)
	<i>n=1761</i>	<i>n=2364</i>	<i>n=2349</i>	<i>n=3982</i>	<i>n=2593</i>

S4 Table. Oligonucleotides used in this study

Plasmide	Oligo	Sequence
pP30D-FRT-ParB-3xFLAG	DEG5562O1	ATAAGCTTATGGCCGCTACGAGATCA
	3xFLAGparBO2	ATGGATCCTCACTTATCATCGTCATCCTTGTAGTCGATGTCATGATCTTTATA ATCACCGTCATGGTCTTTGTAGTCaGCGGCCGCACGGATGTGGGCGAGAAC
pEXG2ΔparS1	MparS1O1	ATATTCTAGAAGGCCGAGGAAGAAGTGC
	MparS1O2	CAGTTCCTCGATTGGGGAGTTTTTCATGTTGAGCCTCGGTTTCTGCCCGT
	MparS1O3	ACGGGCAGAAACCGAGGCTCAACATGAAAACTCCCCAATCGAGGAACTG
	MparS1O4	ATAAGCTTTGGATACCGCGTATCCG
pEXG2ΔparS2	MparS2O1	ATATTCTAGATCGGTTTCTGCCCGTCTG
	MparS2O2	CGGTATCCATGTTTCATGTTGAGCATGGAAAAGTCTCTCAGACCACGACC
	MparS2O3	GGTCGTGGTCTGAGAGACTTTCCATGCTCAACATGAAACATGGATACCG
	MparS2O4	ATAAGCTTAGTTGAGGAAGGACAGCT
pEXG2ΔparS3	MparS3O1	ATAAGCTTCCCCGATCCCTGGAAAAC
	MparS3O2	ATATGAATTCCGAACGCATCCGTCAGGG
	MparS3O3	ATATGAATTCGCGCGCGCAGCATAGCT
	MparS3O4	ATATTCTAGATGGAAGGTGCGACGCGAT
pEXG2ΔparS4	MparS4O1	ATAAGCTTATTGATCAGCAAGTTCGT
	MparS4O2	ATATGAATTCATCACCGTTCAGGCTTC
	MparS4O3	ATATGAATTCGCATGAGCCACTGATCAC
	MparS4O4	ATATTCTAGACCATGAACGGATTGTCGC
pP30D-FRT-parSP1	ParsP1O1	ATAAGCTTGGTACCGCGGCCCTTGTGTCCACAACCGT
	ParSP1O2	ATGGATCCGAATTCGCGTAAGTTACTCAATTT
pP30D-FRT-parS2	ParS2O1	ATATCTGCAGCTTGCTTGAAGATTTGGG
	ParS2O2	ATATGAATTCCTTGATGCTGGAAGAGTC
pP30D-FRT-parS9	ParS9O1	ATATCTGCAGAGGCGCTTGAGCAGGTCTG
	ParS9O2	ATATGAATTCAGGTCCAGGTGATGCTG
pP30D-FRT-parS2-PA0004	ParS0004O1	ATAAGCTTGAACCCTGAGCAGCTGTG
pP30D-FRT-parS9-PA0004	ParS0004O2	ATGGTACCAACGCCGGCAGTATTG
pP30D-FRT-parS2-PA0306	ParS0306O1	ATAAGCTTCCGATCTCCAGGGTGGCG
	ParS0306O2	ATGGTACCGGTTGCTACTGCCCTG
pP30D-FRT-parS2-PA0500	ParS0500O1	ATGGTACCATCCACAGTTCCACGCT
	ParS0500O2	ATAAGCTTGACTTCGGACCTGGAAGA
pP30D-FRT-parS2-PA4778	ParS4778O1	ATAAGCTTGCCAGTGCCGACGTCAAG
	ParS4778O2	ATGGTACCTGGGATGAAAACGGCGG
pP30D-FRT-parS2-PA5170	ParS5170O1	ATAAGCTTGCTGGGCGCGACCATCCG
	ParS5170O2	ATGGTACCGAAATTGCTCGAGATCGG
pEXG2ΔparS5	MparS5O1	ATGGTACCGTGCGAAGGCCTGGTCTG
	MparS5O2	ATATGAATTCCTGATTTCGACCTACCTGCTG
	MparS5O3	ATATGAATTCCTCCGAAAGGGG
	MparS5O4	ATAAGCTTCTTCTTGCTGAACGGC
pEXG2ΔparS6	MparS6O1	ATGGTACCACCCTGCAACGCTGGAA
	MparS6O2	ATATGAATTCGCGCTGGAGTATGCCGGC
	MparS6O3	ATATGAATTCGGCGAGGCCATCGAGCCG
	MparS6O4	ATAAGCTTCAGTTCGTCGGCGTCTGTG

Plasmide	Oligo	Sequence
pEXG2ΔparS10	MparS10O1	ATGGTACCAATTGTTCCGGCCCCCTC
	MparS10O2	ATATGAATTCATCCGGTGCCTACGAAC
	MparS10O3	ATATGAATTCGGCAGCCGGTGACCAGCG
	MparS10O4	ATAAGCTTCTCGAGGACTACGACTAT
parS3 version of the 3 previous plamids	parS3O1	ATATGAATTCCTGCGACCGTTACGCCCA
	parS3O2	ATATGAATTCGAATGCGAGGGCGGCAGC
pEXMΔrrnD	MRRN4O1	ATAAGCTTCAGCGCCTCCTTCTTGG
	MRRN4O2	ATATGAATTCACGGATGGACGGCTACCT
	MRRN4O3	ATATGAATTCCTCAAATAACCGCCGGAAG
	MRRN4O4	ATTCTAGAATCTTCATGATGGCGGTG
pP30D-FRT-parS-attL-PA4822 pP30D-FRT-attL-parS-PA0572	parS3O1bis	ATAAGCTTCCTGCGACCGTTACGCCCA
	parS3O2bis	ATAAGCTTGAATGCGAGGGCGGCAGC
pCXIPA	clup_BglIb1bis	ATATAGATCTAGAACACCTTGCCGATCAGC
	Intdo	ACCATGATTACGCCAAGC
pPSV38-NGFP	GFPNterO1	atatGAATTCGAGGAGGATACATATGGTGAGCAAGGGCGAGGAG
	GFPNterO2	ATGGTACCGCGCCGCCTTGTACAGCTCGTCCAT
	FNTERParBO1	atatGCGGCCGCaGCAGCCAAGAAACGTGGA
	FNTERParBO2	ATAAGCTTTTTCCGACTACCCGCTAC

1. Article "Regional Control of Chromosome Segregation in *Pseudomonas aeruginosa*"

2. Etude du rôle de SMC-ScpAB et lien avec le système ParABS

Toutes les matrices de 3C-seq ont été réalisées par Virginia Lioy, post-doctorante au laboratoire

Comme déjà évoqué précédemment, deux types d'acteurs sont souvent impliqués dans la ségrégation des chromosomes : les systèmes de partition et les condensines bactériennes. En parallèle du travail présenté précédemment concernant le système ParABS, j'ai étudié le rôle du complexe SMC-ScpA/B dans la ségrégation des chromosomes de *P. aeruginosa*. Ce complexe a un rôle important pour la ségrégation des chromosomes chez d'autres bactéries notamment *B. subtilis* et *C. crescentus*.

2.1. Etude préliminaire des effets de SMC-ScpAB sur la ségrégation

Afin de caractériser le rôle de SMC dans le processus de ségrégation, j'ai tout d'abord analysé le pourcentage de cellules anucléées chez le mutant Δsmc par des marquages au DAPI. En moyenne 2% de cellules anucléées sont observées ce qui est beaucoup plus faible qu'un mutant $\Delta parB$.

Même si ce défaut de ségrégation n'est pas important, j'ai voulu caractériser plus particulièrement le rôle de SMC dans l'organisation et la ségrégation des chromosomes. Pour cela, j'ai d'abord analysé le positionnement du chromosome en utilisant le système d'étiquettes fluorescentes (YFP-ParB et TetR-CFP) disponible au laboratoire. Toutes les cellules dont le positionnement du chromosome a été analysé ont été classées en 3 groupes selon leur taille : Les petites cellules dont la taille est inférieure à 2,8 μ m, les cellules moyennes dont la taille est comprise entre 2,8 et 3,5 μ m et les grandes cellules dont la taille est supérieure à 3,5 μ m. Les résultats montrent que globalement le positionnement du chromosome est similaire à celui de la souche sauvage pour les 3 classes de taille de cellules (**Figure 42**). J'ai également représenté les résultats sous forme de courbes de ségrégation qui montrent un délai de séparation des étiquettes, donc de ségrégation, chez le mutant Δsmc (**Figure 43**). En effet, le pourcentage de cellules contenant 2 foci (donc deux copies des étiquettes étudiées), atteint 100% pour des cellules de taille plus grande en Δsmc qu'en WT. Pour l'étiquette la plus proche d'*oriC* sur le replichore droit, le pourcentage de cellules à deux foci atteint 50% quand les cellules ont une taille d'environ 2 μ m en contexte WT, alors que le même pourcentage est atteint plutôt pour des cellules de 2,5 μ m en Δsmc . Ce délai est surtout marqué lorsque l'on s'éloigne des sites *parS*. Pour les loci correspondant aux étiquettes 1,509Mb à droite et 1,812Mb à gauche il y a environ à 60% de cellules à 2 foci pour des cellules de taille 4 μ m alors que pour les mêmes loci en WT il y a déjà 100% de cellules à 2 foci dans des cellules de cette taille.

La mutation de SMC n'a donc pas d'effet majeur sur la ségrégation mais elle entraîne un délai de séparation après répliation.

2. Etude du rôle de SMC-ScpAB et lien avec le système ParABS

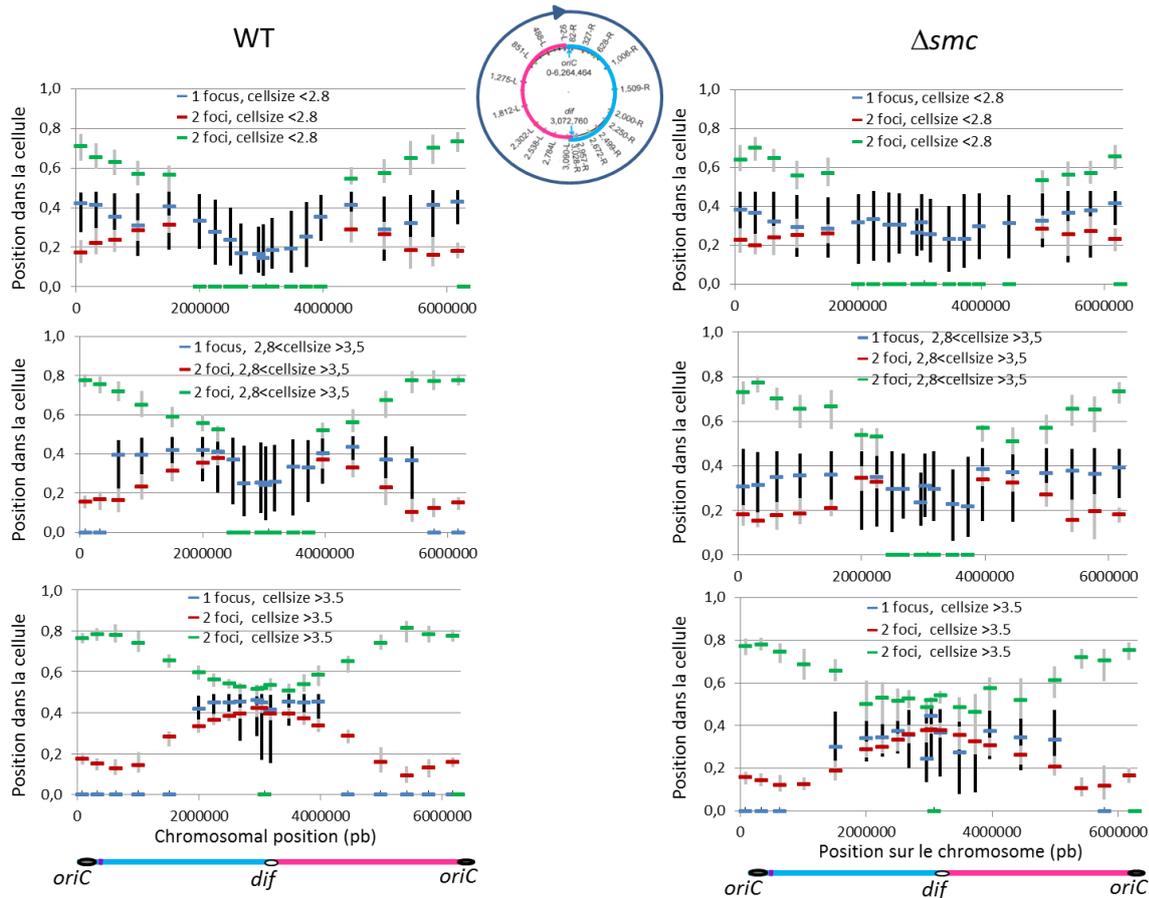


Figure 42 : Etude du positionnement global du chromosome chez un mutant Δsmc

Représentation de la position dans la cellule de chaque étiquette. Les cellules sont séparées en 3 classes de taille : les petites cellules $< 2,8\mu m$, les cellules moyennes de $2,8$ à $3,5\mu m$ et les grandes cellules $> 3,5\mu m$. Pour chaque classe, la position médiane de chaque étiquette est donnée pour les cellules ayant une seule copie de l'étiquette (avant ségrégation ; en bleu) et pour les cellules ayant deux copies de l'étiquette (après ségrégation ; en vert et rouge). Les barres d'erreurs en gris et noir représentent les 25 et 75 pourcentiles dans les cellules ayant une ou deux copies de l'étiquette respectivement. La position de chaque étiquette est donnée en pourcentage de longueur de la cellule. Le zéro représente un pôle de la cellule, le 1 l'autre pôle de la cellule. Les cellules sont orientées arbitrairement (le 0 est le pôle le plus proche d'une copie de l'étiquette). En moyenne 1000 cellules ont été analysées par étiquette. Les résultats sont donnés à gauche pour la souche WT et à droite pour le mutant Δsmc .

2. Etude du rôle de SMC-ScpAB et lien avec le système ParABS

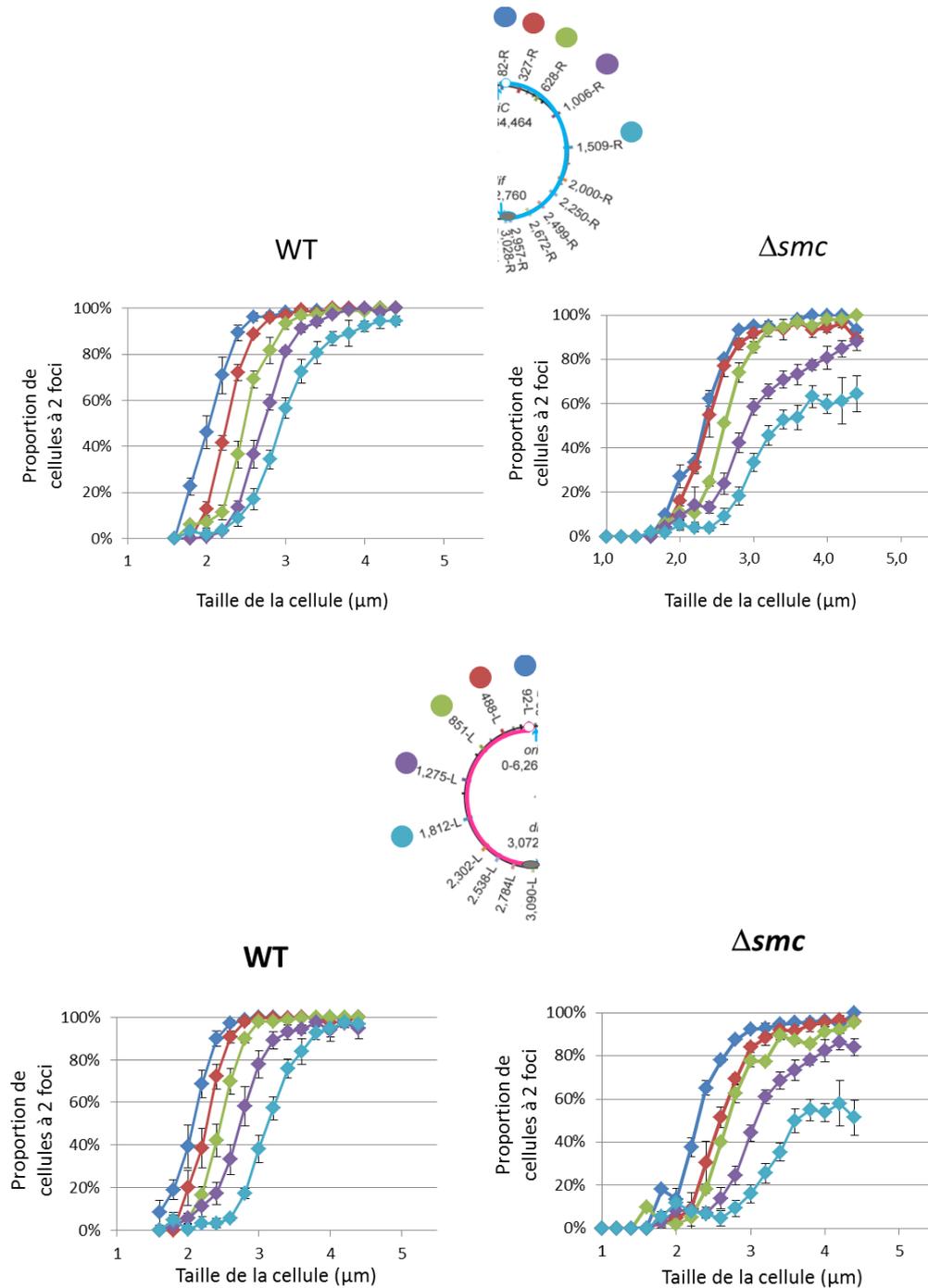


Figure 43 : Pourcentages de cellules à deux foci en fonction de la taille des cellules chez le mutant Δsmc

Les courbes de ségrégation sont représentées pour la souche WT et le mutant Δsmc . Ces courbes donnent la proportion de cellules à 2 foci en fonction de la taille des cellules. Pour chaque étiquette, le losange représente la valeur moyenne du pourcentage de cellules à deux foci et les barres d'erreurs correspondent aux écarts-types.

Les courbes correspondantes aux étiquettes du réplichore droit sont en haut, celles correspondantes aux étiquettes du réplichore gauche en bas. Les couleurs des courbes sont les mêmes que les couleurs des étiquettes indiquées sur le schéma du chromosome.

2. Etude du rôle de SMC-ScpAB et lien avec le système ParABS

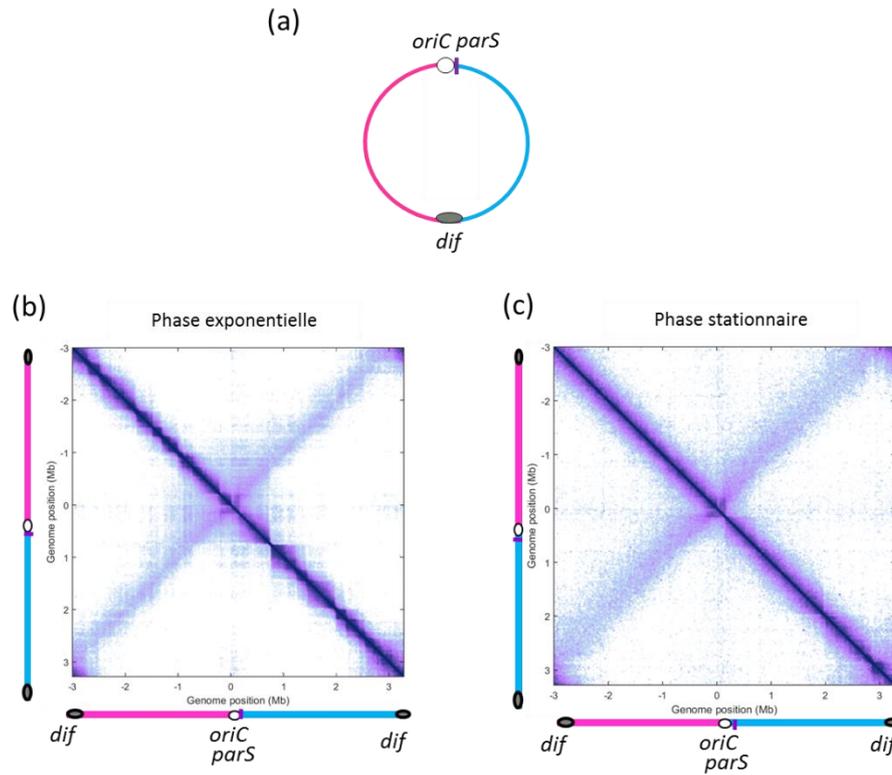


Figure 44: Matrices de contacts de la souche PAO1 de *P. aeruginosa*

(a) Schéma du chromosome avec *oriC* (en blanc), *dif* (en gris), le bras gauche (en rose) et le bras droit (en bleu).

(b) Matrice de contacts de la souche sauvage en phase exponentielle

(c) Matrice de contacts de la souche sauvage en phase stationnaire.

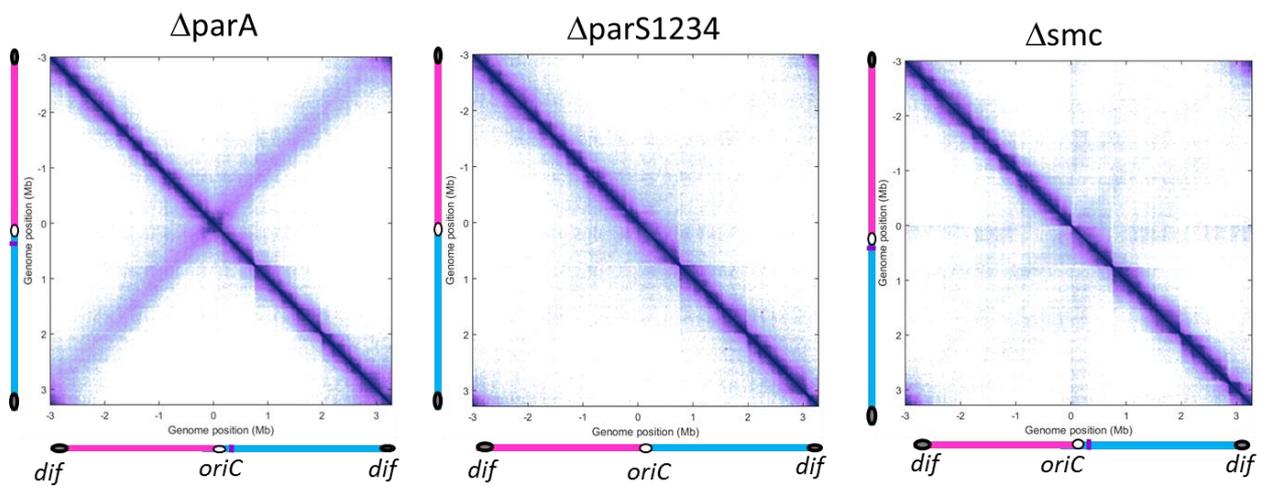


Figure 45: Matrices de contacts $\Delta parA$, $\Delta parS1234$, Δsmc

Matrices de contacts des mutants $\Delta parA$ (à gauche), $\Delta parS1234$ (au milieu) et Δsmc (à droite).

2.2 SMC-ScpAB est responsable de l'alignement des bras sur le chromosome

Au cours de ma thèse, la technique de Capture de Conformation Chromosomique (3C-seq) a été développée au laboratoire. Cette nouvelle technique permet l'étude de la conformation du chromosome de façon globale et ce n'est que très récemment qu'elle a commencé à être appliquée aux bactéries. Des mutants du système ParABS et de SMC ont été analysés grâce à cette technique en comparaison à une souche sauvage afin de voir l'effet de ces mutants sur la conformation du chromosome.

Comme évoqué en introduction, deux diagonales sont visibles sur la matrice de contacts de la souche sauvage PAO1 de *P. aeruginosa* utilisée au laboratoire. La première diagonale, la plus intense (probabilités d'interactions les plus fortes) correspond aux contacts entre les loci proches sur le chromosome et la deuxième diagonale, qui contient moins d'interactions indique des interactions entre les bras du chromosome (entre les loci situés à égale distance d'*oriC*) (**Figure 44**). La présence de ces deux diagonales corrèle avec une organisation longitudinale et est retrouvée pour les bactéries *C. crescentus* et *B. subtilis*. Sur ces matrices, on observe aussi des carrés le long de la première diagonale qui rappellent les CIDs décrits chez *C. crescentus*, *B. subtilis* ou *E.coli* et dont les bordures semblent affectées en phase stationnaire (**Figure 44**). La phase stationnaire n'est pas une phase de croissance et pendant cette phase la transcription est plus faible. Une partie des bordures pourrait donc être due à la présence de longs gènes fortement transcrits comme cela a déjà été observé chez *C. crescentus*. Chez cette dernière en effet, il a été observé qu'en présence de rifampicine, qui est un inhibiteur de la transcription, les bordures des CIDs disparaissent (Le et al., 2013).

Des mutants du système ParABS, $\Delta parA$ et $\Delta parS1234$ et un mutant Δsmc ont été analysés par 3C-seq, afin de déterminer l'effet de ces systèmes sur la conformation du chromosome.

De façon surprenante, la matrice de contacts d'un mutant $\Delta parA$ est très similaire à celle de la souche WT (**Figure 45**) malgré les 20% de cellules anucléées observées chez ce mutant et la désorganisation du positionnement du chromosome dans la cellule. Cela indique qu'un défaut de positionnement et de ségrégation n'affecte pas de façon majeure la structuration en CIDs du chromosome ni les interactions entre les bras du chromosome.

Sur la matrice de contacts du mutant $\Delta parS1234$, seule la diagonale principale est observée comme dans un mutant Δsmc . L'absence de diagonale secondaire pour les deux mutants (**Figure 45**) indique que les deux bras du chromosome n'interagissent pas, ce qui est cohérent avec l'alignement des bras par SMC à partir des *parS* décrit chez *B. subtilis* et *C. crescentus* (Wang, Brandão, Le, Laub, & Rudner, 2017, Tran et al unpublished data). Cela suggère un mécanisme du même type pour SMC chez *P. aeruginosa*

2. Etude du rôle de SMC-ScpAB et lien avec le système ParABS

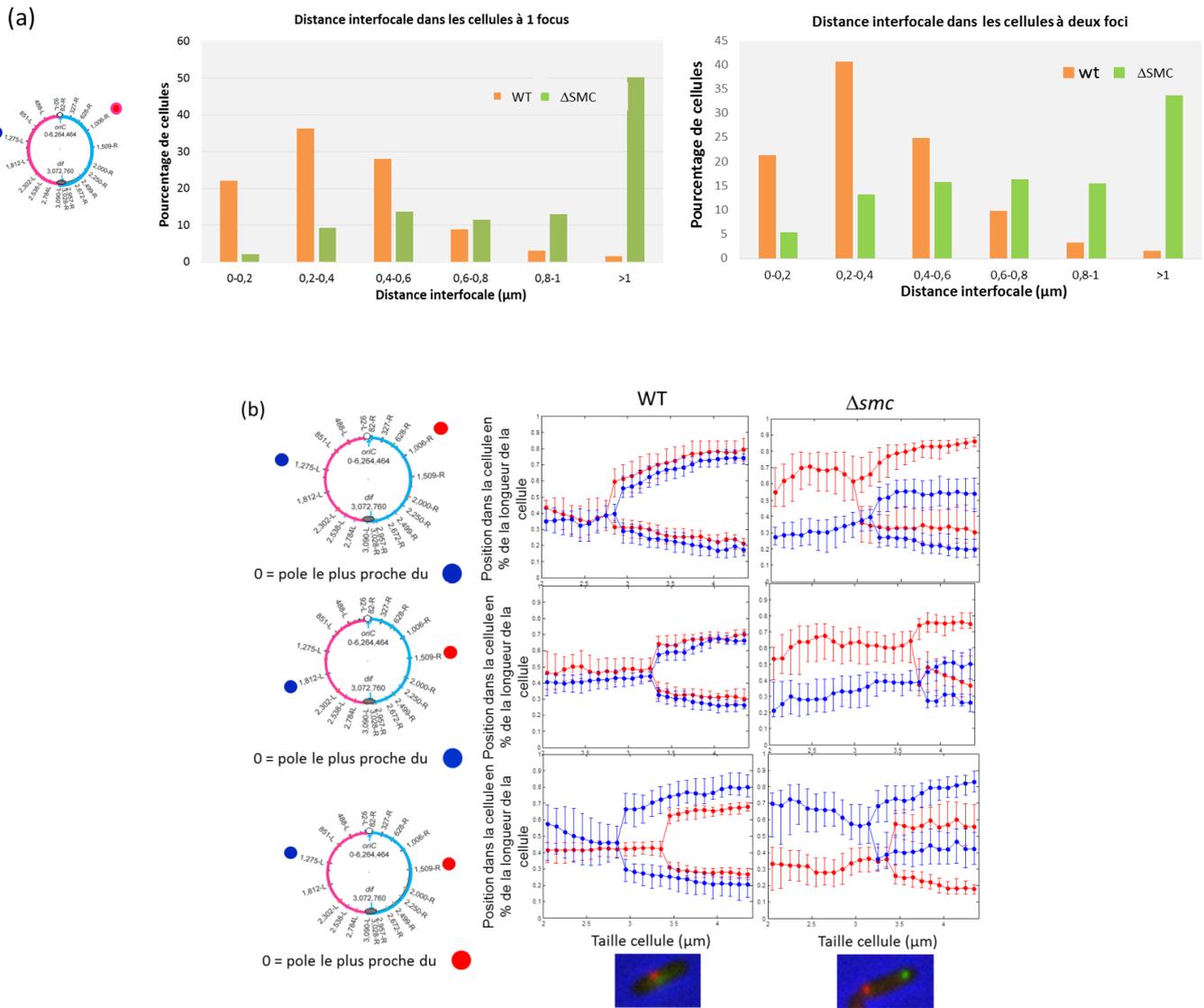


Figure 46: Etude du positionnement des bras du chromosome chez un mutant Δsmc

(a) Histogramme du pourcentage de cellules en fonction de la distance interfocale pour un couple d'étiquettes (1,005-R et 1, 275-L), pour la souche WT (orange) et un mutant ΔSMC (vert). Les résultats sont présentés pour les cellules contenant une copie de chaque étiquette (à gauche) ou deux copies de chaque étiquette (à droite). 1200 cellules environ ont été analysées pour chaque souche.

(b) Représentation de la position cellulaire des étiquettes en pourcentage de longueur de la cellule (0 pour un pôle et 1 pour l'autre pôle) en fonction de la taille de la cellule pour 3 couples d'étiquettes. A chaque fois l'une des étiquettes est représentée en rouge l'autre en bleu. Le premier couple d'étiquettes représenté est celui analysé dans l'histogramme en (a). Les cellules sont orientées arbitrairement selon l'une des étiquettes comme indiqué sur le schéma (cette indication est donnée sur le schéma pour chaque couple d'étiquettes). Les points représentent la position médiane dans la cellule et les barres d'erreurs correspondent aux 25 et 75 percentiles. Une photo représentative d'une cellule WT et une photo d'une cellule du mutant Δsmc sont montrées en bas de la figure. Sur cette photo une étiquette est en rouge, l'autre en vert. En moyenne 1200 cellules ont été analysées par souche.

2. Etude du rôle de SMC-ScpAB et lien avec le système ParABS

Afin de déterminer le positionnement des bras du chromosome dans la cellule en absence d'alignement par SMC, j'ai observé en microscopie à fluorescence la position de deux étiquettes chacune localisée sur un bras différent du chromosome.

L'analyse des 3 couples d'étiquettes (1,005-R et 1,275-L ; 1,812-L et 1,509-R; 1,275-R et 1,509-R), choisis pour leur disposition à environ égale distance d'*oriC*, indiquent que la position des bras change dramatiquement en Δsmc (**Figure 46a et 46b**).

En effet, pour un couple d'étiquettes, l'une à 1,006Mb à droite et l'autre à 1,275Mb à gauche d'*oriC*, dans le cas où il y a une copie de chaque étiquette, 20% des cellules WT ont une distance interfocale entre 0 et 0,2 μ m alors que ce pourcentage diminue à 2% chez le mutant Δsmc . Par contre en Δsmc , cette distance interfocale est supérieure à 1 μ m dans 50% des cellules quand seulement 1% des cellules WT présentent une distance aussi grande (**Figure 46a**). La même tendance est observée quand il y a deux copies de chaque étiquette. La distance interfocale est donc globalement beaucoup plus grande que dans la souche WT.

La position des étiquettes dans la cellule a été étudiée pour les 3 couples d'étiquettes (**Figure 46b**). Dans les 3 cas la position des étiquettes est indiquée l'une en rouge, l'autre en bleu, en fonction de la taille de la cellule. Il y a clairement une modification du positionnement des étiquettes en contexte Δsmc . Les étiquettes ont une localisation cellulaire plutôt similaire dans la souche WT, alors que dans les 3 cas elles sont beaucoup plus espacées, voir opposées chez un mutant Δsmc (que ça soit avant ou après séparation).

L'analyse de deux étiquettes plus proches d'*oriC* (488-L et 327-R) ou deux étiquettes plus proches de *dif* (2,784-L et 2,672-R) montre qu'il n'y a pas à ces positions l'effet observé pour les bras du chromosome (**Figure 47**). Les positions des étiquettes sont en effet assez similaires entre souche WT et mutant Δsmc .

L'ensemble de l'étude du mutant Δsmc montre que même si SMC n'a pas un rôle majeur dans la ségrégation (le pourcentage de cellules anucléées étant faible en son absence), il est responsable de l'alignement des bras et en son absence, l'organisation longitudinale est perdue suite à un repositionnement majeur des bras du chromosome.

2. Etude du rôle de SMC-ScpAB et lien avec le système ParABS

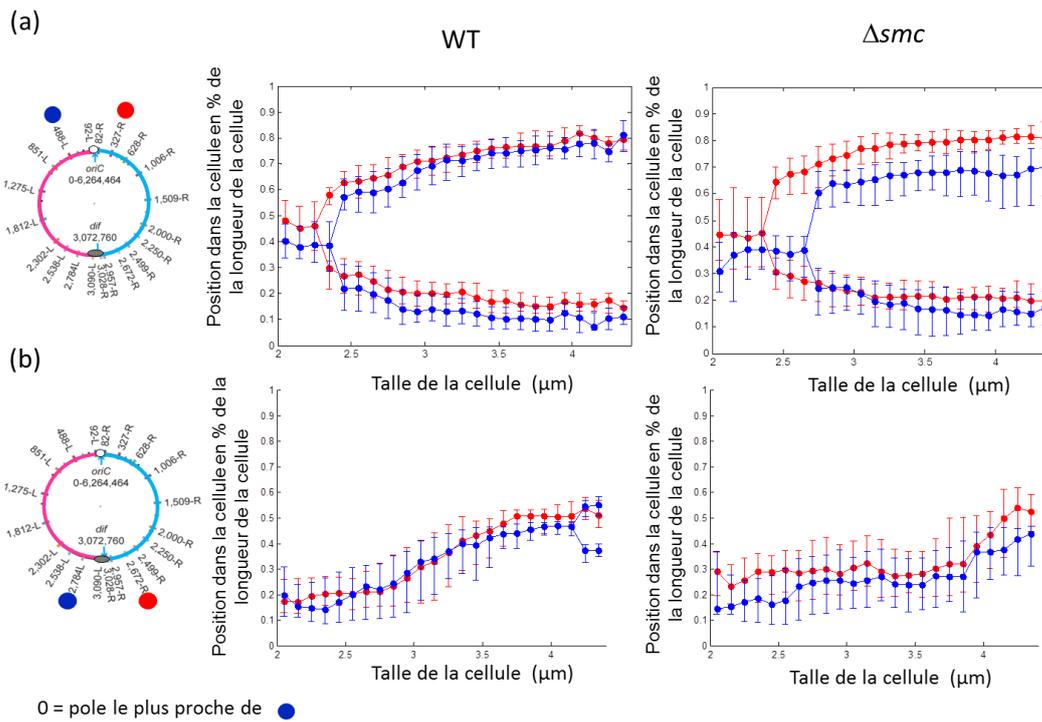


Figure 47: Positionnement des régions autour d'*oriC* et de *dif* dans la cellule.

Analyse en microscopie de deux couples d'étiquettes indiqués dans les deux cas sur la carte du chromosome (à gauche). La position des étiquettes en pourcentage de longueur de la cellule (0 pour un pôle et 1 pour l'autre pôle) est indiquée sur les courbes (à droite), en fonction de la taille de la cellule, pour la souche WT et chez le mutant Δsmc . Les points représentent la position médiane dans la cellule et les barres d'erreurs correspondent aux 25 et 75 pourcentiles. Les cellules sont orientées arbitrairement selon la position de l'étiquette indiquée en bleu. 1000 cellules ont été analysées en moyenne.

(a) étiquettes autour de l'origine de réplication (488-L et 327-R)

(b) étiquettes dans la région de terminaison (2,784-L et 2,672-R)

2.3. Interaction fonctionnelle entre SMC/ParABS : impact sur le positionnement du chromosome dans la cellule.

J'ai ensuite exploré plus en détail le lien entre le système ParABS et le complexe SMC dans le processus d'alignement des bras, afin notamment de voir si la diagonale est initiée au niveau de *parS* et s'il y a une différence d'alignement selon que le *parS* est dans ou en dehors de la « zone de compétence ». J'ai analysé pour cela la conformation du chromosome dans plusieurs souches ayant un site *parS* déplacé sur le chromosome via des expériences de 3C-seq. J'ai étudié deux souches $\Delta parS1234 parS+552$ et $\Delta parS1234 parS-330 \Delta rrnD$ (le *rrnD* serait une barrière pour la compétence de *parS*) qui n'ont pas de défauts majeurs de ségrégation et une souche, dont le site *parS* est situé en dehors de la « zone de compétence » $\Delta parS1234 parS attL 851-L attR 82-R$.

Une diagonale secondaire est visible sur les matrices de contacts obtenues pour les 3 souches évoquées précédemment mais la position de cette diagonale est modifiée en fonction de la position du site *parS* (en comparaison avec la souche $\Delta parS123$ qui contient un seul site *parS*, *parS4*, situé juste à côté d'*oriC*) (**Figure 48**).

Quelle que soit la position du site *parS*, SMC juxtapose les régions d'ADN voisines du site *parS*. Les bras du chromosome sont donc alignés par SMC à partir de *parS*. Une fois encore, il n'y a pas de différence entre un site *parS* dans la « zone de compétence » donc qui permet la ségrégation et un *parS* hors de la « zone de compétence » ne permettant pas un processus de ségrégation correcte. De plus, pour deux des souches étudiées précédemment ($\Delta parS1234 parS+552$ et $\Delta parS1234 parS-330 \Delta rrnD$, et pour la souche $\Delta parS123$ aussi), il n'y a pas de diagonale secondaire en absence de SMC sur les matrices de contacts (**Figure 48**) et les pourcentages de cellules anucléées sont plus élevés qu'en présence de SMC (**Figure 49**). Le pourcentage passe en effet de 7 à 15,7% en absence de SMC pour la souche $\Delta parS1234 parS+552$ et de 2,4 à 14 % pour la souche $\Delta parS1234 parS-330 \Delta rrnD$. Cela confirme qu'il n'y a pas de lien évident entre la diagonale d'interaction et le processus de ségrégation. Cela indique aussi que l'impact de la mutation de SMC serait plus important dans le cas où le *parS* est déplacé qu'en contexte sauvage et l'alignement des bras pourrait ainsi être plus important pour le processus de ségrégation dans le cas où le site *parS* est déplacé.

Il a été observé précédemment que dans les souches ayant un site *parS* déplacé, ce site est repositionné dans la cellule et qu'il est le premier ségrégué (*lagage et al*). L'ensemble des résultats obtenus dont les matrices de contacts suggèrent donc un repositionnement global du chromosome dans la cellule que j'ai étudié via de la microscopie.

Afin de savoir s'il y a un changement de positionnement du chromosome lorsque le *parS* est déplacé chez *P. aeruginosa*, j'ai réalisé des études en microscopie du même type que celles réalisées pour le mutant Δsmc . Ainsi j'ai d'abord analysé la localisation cellulaire de 20 positions chromosomiques pour les deux souches $\Delta parS1234 parS+552$ et $\Delta parS1234 parS-330 \Delta rrnD$ en comparaison à une souche sauvage.

2. Etude du rôle de SMC-ScpAB et lien avec le système ParABS

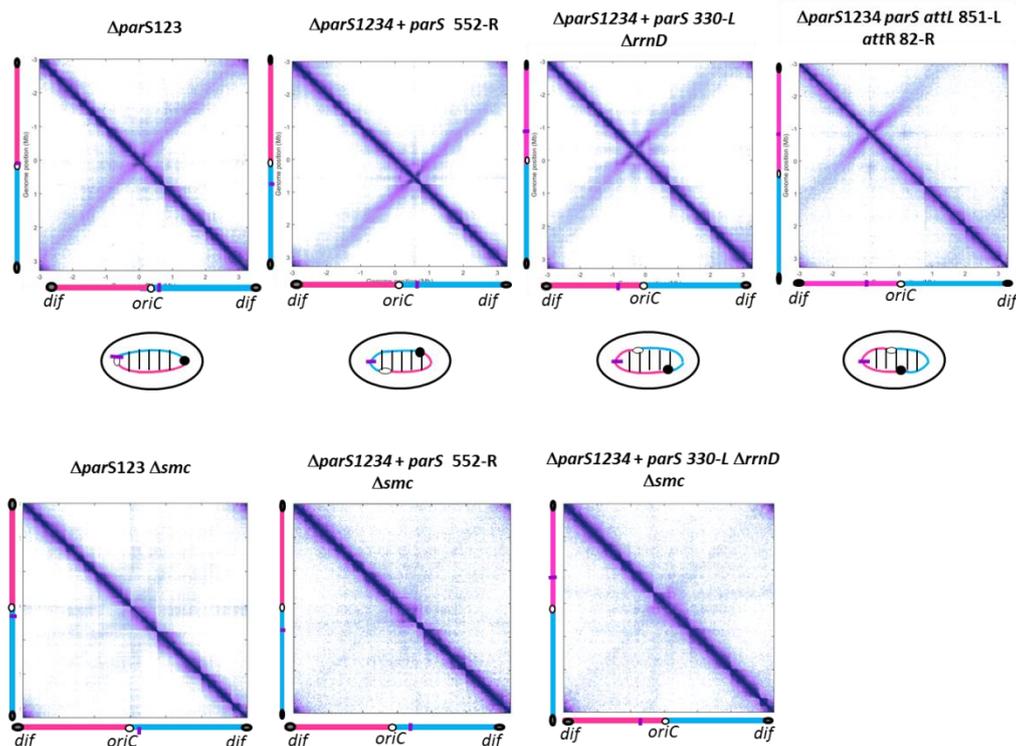


Figure 48: positionnement des bras du chromosome : microscopie double étiquette/3C-seq
 Matrice de contacts pour les souches $\Delta parS123$, $\Delta parS1234 parS 552 kb$, $\Delta parS1234 parS -330 kb \Delta rrnD$ et $\Delta parS1234 parS attL 851-L attR 82-R$. Pour chaque matrice de contacts, une représentation du chromosome dans la cellule est présentée (en dessous, extrapolation pour la souche $parS1234 parS attL 851-L attR 82-R$). Pour les souches $parS123$, $\Delta parS1234 parS 552 kb$, $\Delta parS1234 parS -330 kb \Delta rrnD$, les matrices de contacts en absence de SMC sont présentées en bas de la figure.

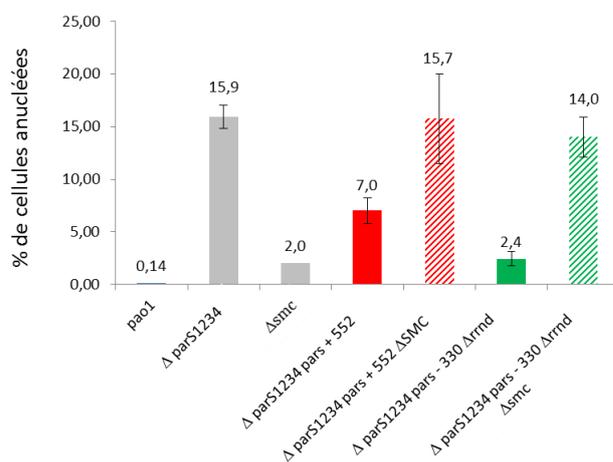


Figure 49 : Ségrégation des souches ayant un parS déplacé sur le chromosome en contexte Δsmc
 Histogramme représentant le pourcentage de cellules anucléées pour les souches $\Delta parS1234 parS 552 kb$ (rouge) et $\Delta parS1234 parS -330 kb \Delta rrnd$ (vert) en contexte WT (couleurs pleines) et ΔSMC (hachuré). L'histogramme donne les valeurs moyennes et les barres d'erreurs représentent l'écart-type. Au moins 3 expériences ont été réalisées par souche avec 250 à 300 cellules analysées par expérience.

2. Etude du rôle de SMC-ScpAB et lien avec le système ParABS

Les résultats sont présentés dans la **Figure 50**. Les cellules étudiées ont été divisées en trois groupes de taille comme dans l'analyse du mutant Δsmc . Dans la souche sauvage, dans les petites comme les grandes cellules, les étiquettes les plus proches de l'origine de réplication et donc aussi les plus proches du site *parS* ont les plus grandes distances interfocales et la position de la plupart des loci chromosomiques est ensuite définie par leur distance par rapport au site *parS* situé à côté d'*oriC*. Dans la souche $\Delta parS1234 parS+552$, on observe un décalage du positionnement du chromosome par rapport à la nouvelle localisation du site *parS*. Ainsi pour la troisième étiquette à partir d'*oriC* sur le bras gauche on observe que la distance entre les deux copies de l'étiquette (l'une en rouge, l'autre en vert) est beaucoup plus petite pour la souche $\Delta parS1234 parS+552$ que pour la souche sauvage. A l'inverse pour une étiquette proche de la nouvelle position du site *parS* (comme la cinquième sur le bras droit en partant d'*oriC*) on observe une distance interfocale plus grande qu'en WT. Le même type de résultat est observé pour la souche $\Delta parS1234 parS-330 \Delta rrnD$. (**Figure 50**).

Donc dans les deux cas le déplacement d'un site *parS* entraîne un repositionnement global du chromosome de telle façon à ce que le site *parS* ait environ la même localisation cellulaire. La position des autres loci est donc définie par leur distance au site *parS*. Un tel repositionnement a déjà été observé chez *C. crescentus* où une inversion génétique qui éloigne *parS* à 400kb d'*oriC* entraîne un repositionnement global du chromosome. De même chez *V. cholerae*, le déplacement d'un site *parS* à 600kb sur le chromosome 1 entraîne un repositionnement du chromosome dans la cellule (David et al., 2014; Toro et al., 2008).

Afin d'étudier plus précisément l'alignement des bras du chromosome lorsque le site *parS* est déplacé, j'ai réalisé comme pour le mutant Δsmc une étude de couples d'étiquettes fluorescentes (une étiquette est placée sur chaque bras du chromosome). J'ai choisi les couples d'étiquettes à l'aide des résultats de microscopie précédents. J'ai en effet regardé les étiquettes de chaque bras qui ont une position cellulaire similaire (**indiquées en figure 50**). Dans la souche sauvage, lorsqu'une étiquette est placée à 1,5Mb à droite et une autre à 1,8Mb à gauche de l'origine de réplication, on observe que ces deux étiquettes sont assez proches dans la cellule. Pour les cellules ayant une copie de chaque étiquette, la distance interfocale est en effet assez faible pour la plupart des cellules analysées avec environ 25% des cellules qui ont une distance entre 0-0,2 μm et presque 35% des cellules qui ont une distance entre 0,2-0,4 (**Figure 51**). En comparaison moins de 1% des cellules ont une distance entre les étiquettes plus grande que 1 μm . Le même couple d'étiquettes analysé dans la souche $\Delta parS1234 parS 552-R$ montre des distances beaucoup plus grandes donc des loci plus éloignés dans la cellule avec 30% de cellules ayant une distance plus grande que 1 μm contre seulement 1% de cellule ayant une distance entre 0-0,2 μm . Il y a donc une perte de la colocalisation de ces loci.

2. Etude du rôle de SMC-ScpAB et lien avec le système ParABS

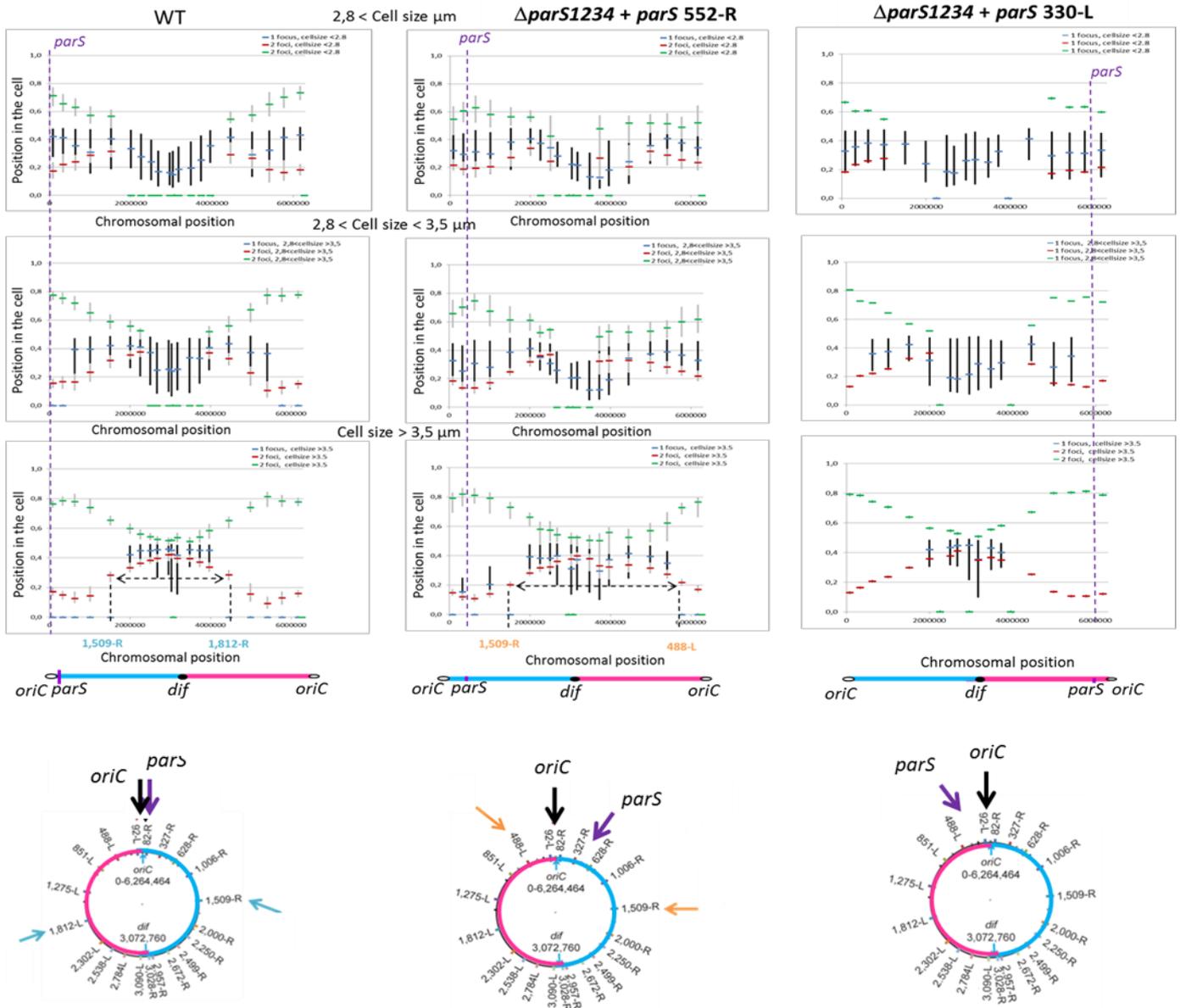


Figure 50 : Position globale du chromosome dans la cellule dans des souches ayant un site *parS* déplacé.

Analyse en microscopie de chacune des étiquettes indiquées sur le schéma du chromosome (en bas de la figure). Représentation de la position dans la cellule de chaque étiquette. Les cellules sont séparées en 3 classes de taille : les petites cellules <2,8μm, les cellules moyennes de 2,8 à 3,5μm et les grandes cellules >3,5μm. Pour chaque classe, la position médiane de chaque étiquette est donnée pour les cellules ayant une seule copie de l'étiquette (avant ségrégation ; en bleu) et pour les cellules ayant deux copies de l'étiquette (après ségrégation ; en vert et rouge). Le 0 représentent un pôle, le 1 l'autre pôle. Les barres en gris et noir représentent les pourcentiles 25 et 75 dans les cellules ayant une ou deux copies de l'étiquette respectivement.

Microscopie pour la souche WT à gauche, la souche $\Delta parS1234 parS 552$ kb au centre et la souche $\Delta parS1234 parS -330$ kb $\Delta rrnD$ à droite. 1000 cellules ont été analysées par étiquette en moyenne.

2. Etude du rôle de SMC-ScpAB et lien avec le système ParABS

Chez ce même mutant, lorsque les deux étiquettes sont placées à 1,5Mb à droite et 488kb à gauche d'*oriC*, elles sont plutôt proches dans la cellule, avec un peu moins de 20% des cellules pour lesquelles la distance interfocale est entre 0 et 0,2 μm et presque 40% des cellules pour lesquelles la distance est entre 0,2 et 0,4 μm . La même tendance est observée lorsqu'une étiquette est placée à 2Mb à droite et l'autre à 1,275 Mb à gauche d'*oriC*. Ainsi dans la souche $\Delta\text{parS1234}$ *parS* 552-R les loci marqués par l'étiquette à 1,5Mb sont plus proches dans la cellule de ceux à 488kb à gauche d'*oriC* alors qu'ils sont plus proches de ceux situés à 1.8Mb à gauche d'*oriC* en WT (**Figure 51**). La même tendance est observée pour les cellules ayant deux copies de chaque étiquette.

Cette étude montre que lorsque le *parS* est déplacé, il y a un changement de symétrie. Deux loci situés environs à égale distance de la nouvelle position du site *parS* sont ainsi proches dans la cellule dans la souche $\Delta\text{parS1234}$ *parS* 552-R alors que ce sont les locus à égales distances de *parS* donc d'*oriC* qui sont proches dans la souche sauvage.

Ces résultats corrélient avec le repositionnement global du chromosome observé précédemment avec l'observation du décalage de la deuxième diagonale sur le chromosome en 3C-seq.

2. Etude du rôle de SMC-ScpAB et lien avec le système ParABS

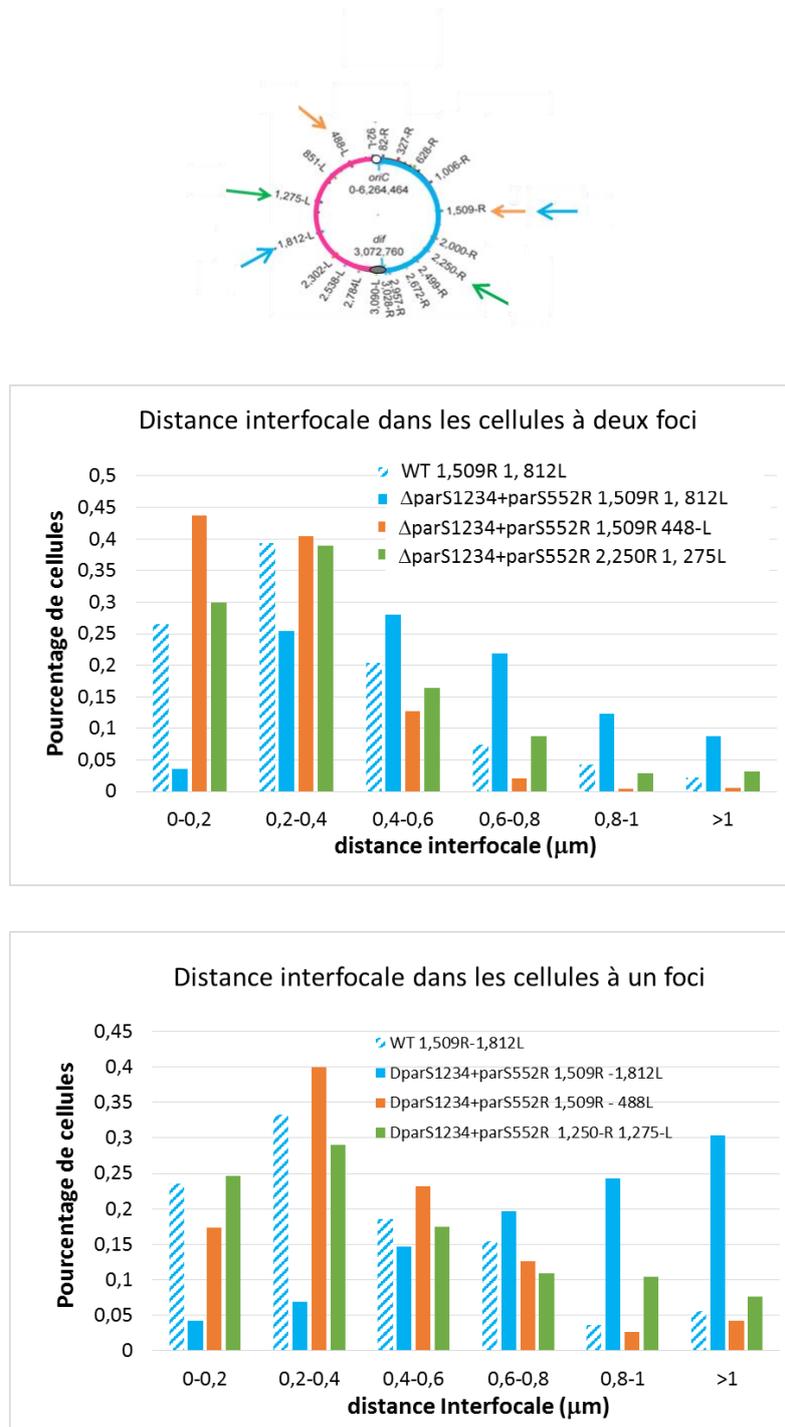


Figure 51 : Etude du positionnement cellulaire des bras du chromosome dans la souche ΔparS1234 parS 552 kb

Schéma des couples d'étiquettes analysés en microscopie pour la souche WT (en haut à gauche) et pour la souche ΔparS1234 parS 552 kb (en haut à droite). Les histogrammes (en bas) donne les pourcentages de cellules selon la distance interfocale pour chaque couple d'étiquettes (WT et ΔparS1234 parS 552 kb). Les résultats sont présentés pour les cellules ayant une copie de chaque étiquette (en centre) et dans le cas des cellules ayant deux copies de chaque étiquette (après ségrégation, en bas de la figure). 600 cellules en moyennes ont été analysées.

2.4. Effet de la présence de 2 *parS* fonctionnels sur le chromosome

Après avoir montré l'impact du déplacement d'un site *parS* sur le positionnement du chromosome et sur l'alignement des bras via SMC et avoir mis en évidence le couplage entre *oriC* et *parS*, je me suis intéressée à l'impact de la présence de deux sites *parS* distants sur le positionnement et le processus de ségrégation des chromosomes.

S'il y a deux sites *parS* distants sur les chromosomes, plusieurs possibilités peuvent être envisagées : soit les deux sites pourraient initier la ségrégation de façon équivalente soit l'un des deux pourrait être dominant par rapport à l'autre. S'il y a un lien entre compétence du *parS* et distance *oriC-parS*, une hypothèse est que le site le plus proche d'*oriC* soit le site dominant pour l'initiation de la ségrégation, pour le positionnement global du chromosome (ségrégation symétrique par rapport à ce site *parS*) ou encore pour l'alignement des bras par SMC (deuxième diagonale décalée selon la position de ce *parS*).

Concernant l'initiation de la ségrégation, j'ai utilisé une approche de microscopie déjà utilisée précédemment pour étudier la souche $\Delta parS1234 + parS552-R$ (Lagage *et al* et **Figure 52**). Pour cela, j'ai construits une souche $\Delta parS123 + parS552-R$ contenant une étiquette fluorescente à coté de chaque *parS* (-92 kb et +628kb) et je me suis intéressée aux cellules contenant 3 foci fluorescents c'est-à-dire ou seule l'une des deux étiquettes est répliquée et séparée. Les résultats indiquent que dans la souche WT, l'initiation se fait majoritairement au niveau des *parS* donc à côté d'*oriC* (**Figure 52 et 53**). Dans la souche $\Delta parS1234 + parS552-R$ l'initiation de la ségrégation se fait au niveau du *parS* déplacé dans la majorité des cellules (**Figure 52**). Pour la souche $\Delta parS123 + parS552-R$ les résultats montrent que dans 2/3 des cellules, la position +628kb est ségrégée avant la position -92kb et que c'est l'inverse pour un tiers des cellules seulement (**Figure 52 et 53**). De façon surprenante le site d'initiation de la ségrégation serait donc majoritairement le site *parS* le plus éloigné d'*oriC*, ce qui ne confirme pas l'hypothèse de départ. Cela veut aussi dire que le site le plus proche d'*oriC* est répliqué mais que la présence du deuxième *parS* empêche sa ségrégation.

J'ai ensuite regardé le positionnement des bras du chromosome à l'aide de couples d'étiquettes fluorescentes (une sur chaque bras). Pour les cellules ayant une seule copie de chaque étiquette, lorsque l'une est à 1,812Mb à gauche et l'autre à 2,000Mb à droite, la distance entre les étiquettes est plus grande dans le cas de la souche ayant deux *parS* comparée à la souche sauvage. Il y a plus de 25% des cellules ayant une distance entre 0 et 0,2 μm contre 10% dans la souche $\Delta parS123 parS + 552-R$ et 5% entre 0,8 et 1 μm dans la souche sauvage contre 10% dans la souche $\Delta parS123 parS + 552-R$. Ces résultats montrent qu'il y a une perte de l'alignement par rapport au *parS* proche d'*oriC* et suggèrent à nouveau que le *parS* à +552kb d'*oriC* serait dominant. Cependant, pour une étiquette placée à 1,509Mb à droite et 488kb à gauche peu de différence est observée entre WT et souche $\Delta parS123 parS + 552-R$. Il n'y a donc apparemment ni alignement du chromosome par rapport à l'un ni par rapport à l'autre site *parS* (**Figure 54**). La même tendance est observée dans les cellules ayant deux copies de chaque étiquette.

2. Etude du rôle de SMC-ScpAB et lien avec le système ParABS

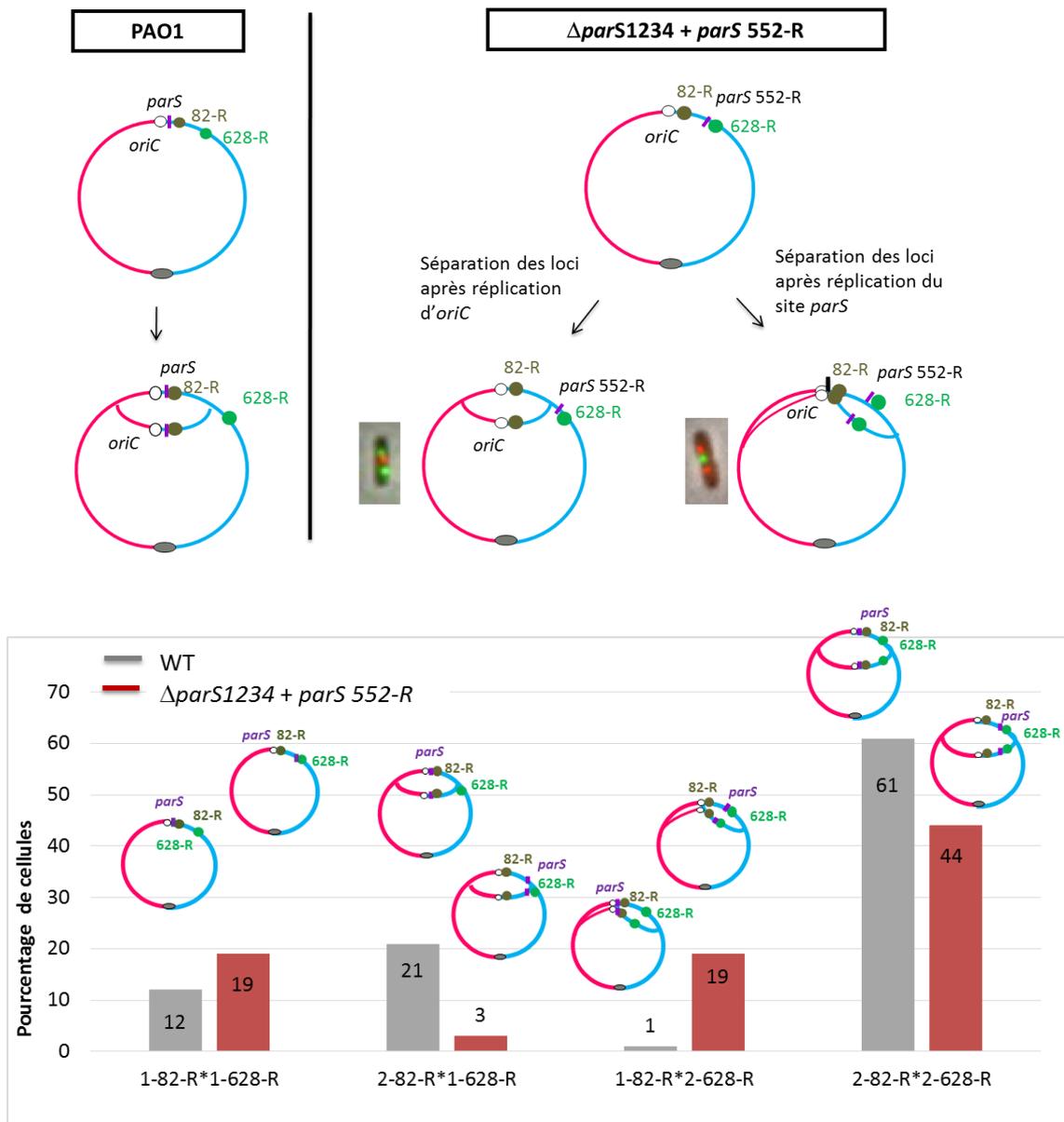


Figure 52 : Etude de l'initiation de la ségrégation dans le cas de la souche $\Delta parS1234 parS 552 kb$

(a) schéma explicatif de l'expérience de microscopie et des différents résultats possibles en WT et dans le cas de la souche $\Delta parS1234 parS 552-R$ (illustrées par des photos pour cette souche). 2 étiquettes sont utilisées l'une est indiquée en gris, l'autre en vert.

(b) Résultats obtenus présentés sous la forme d'un histogramme sur lequel est représenté le pourcentage de cellules anucléées en fonction du nombre de foci de chacune des étiquettes (le nombre de chaque étiquette est indiqué en bas de l'histogramme). Ces résultats sont illustrés par des schémas représentant les configurations du chromosome correspondantes. (WT en gris, $\Delta parS1234 parS 552-R$ en rouge). Les deux histogrammes du centre représentent les cellules à 3 foci étudiées dans cette analyse. Environ 800 cellules par souche ont été analysées.

2. Etude du rôle de SMC-ScpAB et lien avec le système ParABS

La matrice de contacts obtenue par 3C-seq pour la souche $\Delta parS123$ *parS* + 552-R montre deux débuts de deuxièmes diagonales. Cela suggère que l'alignement des bras par SMC est initié au niveau des deux sites *parS* mais est ensuite interrompu. **(Figure 55 (a))**. L'alignement des bras du chromosome est donc très perturbé par la présence d'un deuxième site *parS* éloigné sur le chromosome. Ces résultats confirment ceux de microscopie qui montrent qu'il n'y a pas d'alignement du chromosome ni à partir de l'un ni à partir de l'autre des deux *parS*. L'ensemble de ces résultats montrent en tous cas que la présence de deux sites *parS* sur le chromosome impacte fortement la ségrégation, le positionnement et la conformation du chromosome et que le *parS* le plus proche d'*oriC* ne serait pas dominant sur l'autre site. Le système ParABS ne serait donc pas capable de différencier des *parS* en cis de *parS* en trans.

Afin de comprendre ces défauts observés, j'ai construit d'autres souches possédant deux *parS* à d'autres positions sur le chromosome. J'ai d'abord testé l'effet de la présence de deux *parS* plus proches l'un de l'autre (15kb à droite et 330kb à gauche ; 15kb à droite et 340kb à droite). J'ai observé des défauts de ségrégation moins importants indiqués par un pourcentage de cellules anucléées plus bas dans ces deux cas. Ils sont en effet de 1,77 et 2,26% contre 5,7% dans la souche $\Delta parS123$ + *parS552-R* **(Figure 56)**.

J'ai ensuite testé des positions plus éloignées dans la « zone de compétence » (330kb à gauche et 552 à droite). A ces positions plus éloignées, le pourcentage de cellules anucléées est de 10,3% donc plus élevé que précédemment. La matrice de contacts réalisée pour cette souche **(Figure 55 (b))** montre deux débuts de deuxièmes diagonales (comme pour la souche $\Delta parS123$ *parS* + 552-R).

J'ai continué en testant des positions plus éloignées avec un site dans la « zone de compétence » et un site en dehors de cette zone (15kb à droite et 850kb à gauche ; 330kb à gauche et 850kb à gauche ; 15kb à droite et 1Mb à gauche ; 15kb à droite et 1,2Mb à droite). On observe alors des pourcentages plus variables avec une différence entre les sites situés sur le bras gauche et ceux sur le bras droit **(Figure 56)**. Pour les sites situés sur le bras droit, les pourcentages de cellules anucléées sont plus élevés. Il est en effet de 12,3% environ quand l'un des sites *parS* est à 15kb et l'autre à 1Mb ou 1,2Mb. Pour les couples dont l'un des sites est à gauche, les pourcentages sont un peu moins élevés (5,44% et 8,36%). Donc la distance semble avoir un impact sur la ségrégation pour les sites à droite d'*oriC* mais cela est plus compliqué pour les sites à gauche.

2. Etude du rôle de SMC-ScpAB et lien avec le système ParABS

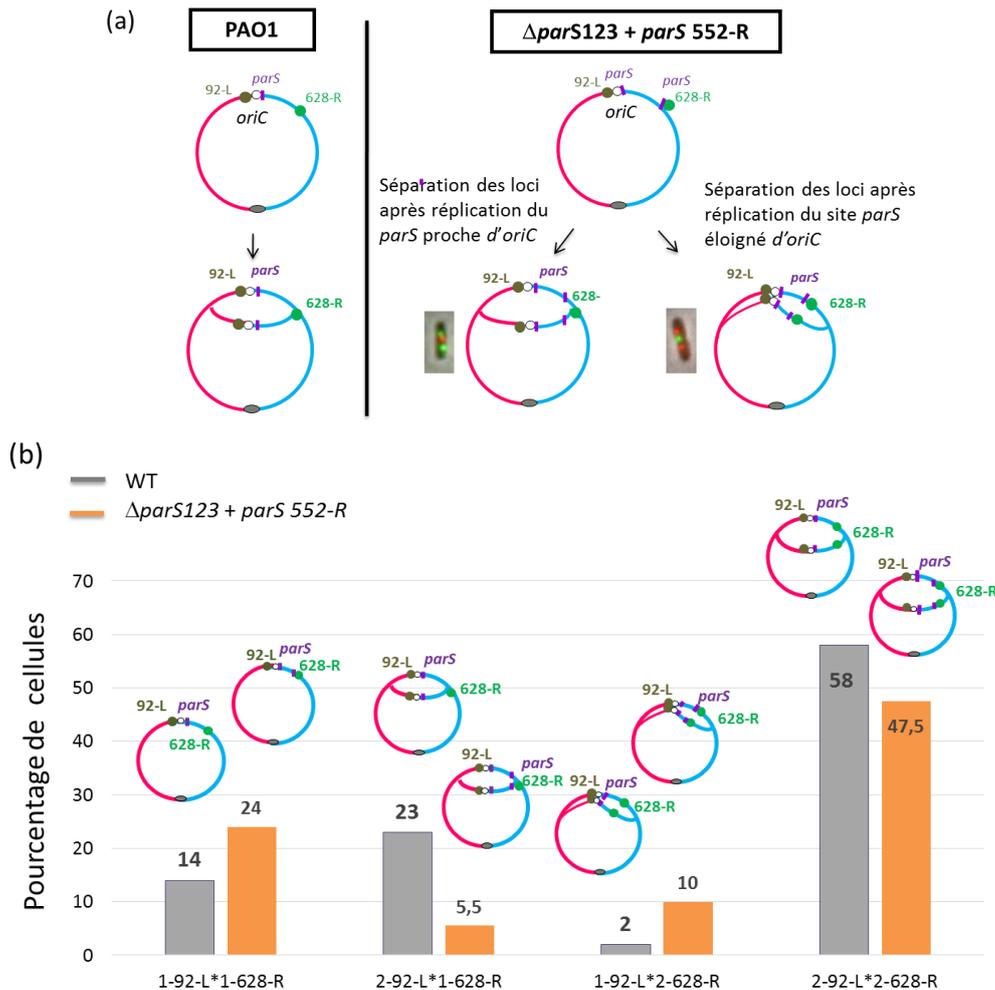


Figure 53 : Etude de l'initiation de la ségrégation dans le cas de la souche $\Delta parS123 parS 552 kb$

(a) schéma explicatif de l'expérience de microscopie et des différents résultats possibles en WT et dans le cas de la souche $\Delta parS123 parS 552-R$ (illustrées par des photos pour cette souche). 2 étiquettes sont utilisées, l'une est indiquée en gris, l'autre en vert.

(b) Résultats obtenus présentés sous la forme d'un histogramme sur lequel est représenté le pourcentage de cellules anucléées en fonction du nombre de foci de chacune des étiquettes (le nombre de chaque étiquette est indiqué en bas de l'histogramme). Ces résultats sont illustrés par des schémas représentant les configurations du chromosome correspondantes. (WT en gris, $\Delta parS123 parS 552-R$ en orange). Les deux histogrammes du centre représentent les cellules à 3 foci étudiées dans cette analyse. Environ 800 cellules par souche ont été analysées.

2. Etude du rôle de SMC-ScpAB et lien avec le système ParABS

Des études seront encore nécessaires pour comprendre l'effet de la présence de deux sites *parS* sur le chromosome mais en tous cas la ségrégation et le positionnement du chromosome dans la cellule sont impactés par la présence de deux *parS*. Ces résultats montrent une fois de plus que le problème posé par le positionnement d'un site *parS* hors de la « zone de compétence » n'est pas lié à fonctionnalité du système ParABS. Pour les souches $\Delta parS123 + parS552-R$ et $\Delta parS123 parS-330$, les pourcentages de cellules anucléées en absence de SMC sont plus élevés (9,7% au lieu de 5,7% et 12,9% au lieu de 10,3% respectivement) indiquant que SMC pourrait avoir un rôle plus important dans les souches ayant deux *parS* distants comme cela est observé quand un seul site *parS* est déplacé.

2. Etude du rôle de SMC-ScpAB et lien avec le système ParABS

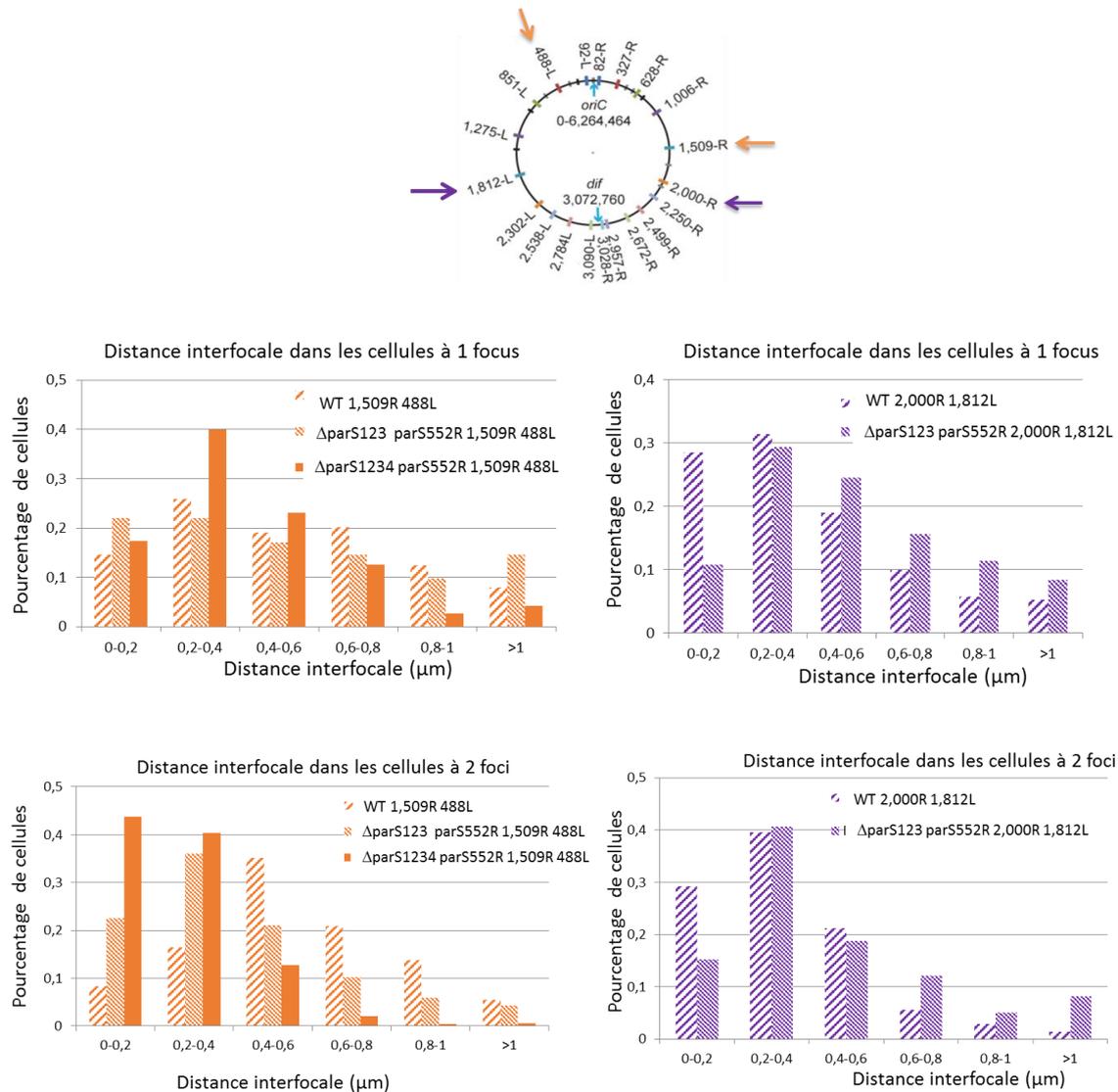


Figure 54 : Positionnement des bras du chromosome dans la souche Δ parS123 parS 552 kb.

Schéma des couples d'étiquettes analysés en microscopie pour la souche WT, pour la souche Δ parS123 parS 552 kb et pour la souche Δ parS1234 parS 552 kb (représentée dans un des deux cas). L'histogramme donne le pourcentage de cellules selon la distance interfocale, pour chaque couple d'étiquettes. Chaque couleur (orange et violet) correspond à un couple d'étiquettes. L'histogramme est représenté en hachuré pour la souche WT, en carreaux pour la souche Δ parS123 parS 552 et en traits pleins pour la souche Δ parS1234 parS 552 kb.

Les résultats sont présentés pour les cellules ayant une copie de chaque étiquette et dans le cas des cellules ayant deux copies de chaque étiquette (après ségrégation). 500 à 1000 cellules ont été analysées selon les souches.

2. Etude du rôle de SMC-ScpAB et lien avec le système ParABS

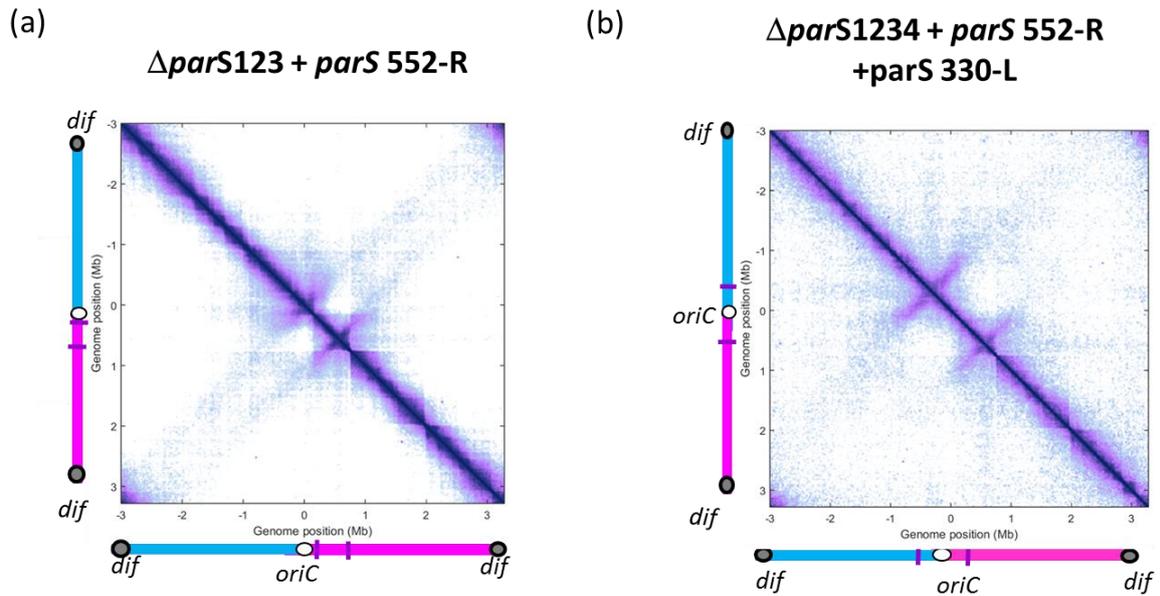


Figure 55 : 3C-seq pour deux souches possédant deux sites *parS* distants.

(a) Matrice de contacts de la souche $\Delta parS123 + parS 552-R$

(b) Matrice de contacts de la souche $\Delta parS1234 + parS 552-R + parS 330-L$

2. Etude du rôle de SMC-ScpAB et lien avec le système ParABS

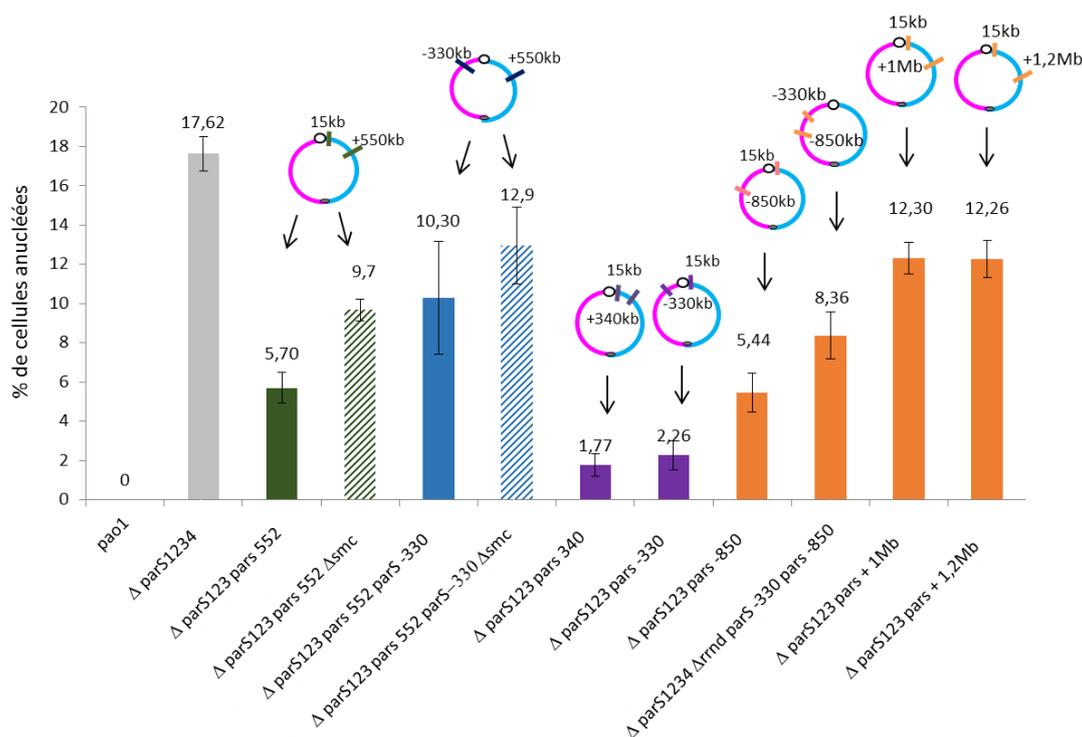


Figure 56 : Ségrégation chez différentes souches qui comportent deux sites *parS* espacés sur le chromosome

Histogramme représentant le pourcentage de cellules anucléées dans les différentes souches ayant deux sites *parS*. L'histogramme correspondant à la souche $\Delta parS123 + parS552kb$ est en vert. L'histogramme des souches pour lesquelles la distance entre les deux sites *parS* plus petite que la souche précédente sont en violet. La souche représentée en bleu a un *parS* de chaque côté d'*oriC* dans la « zone de compétence ». Les souches ayant un *parS* dans la « zone de compétence » et un *parS* en dehors, espacés par de plus grandes distances, sont représentées en orange.

Les pourcentages de cellules anucléées de la souche PAO1 et $\Delta parS1234$ sont aussi représentés en contrôle. Au moins 3 expériences ont été réalisées par souche avec 250 à 300 cellules analysées par expérience. Les valeurs indiquées sont des moyennes et les barres d'erreurs représentent les écarts-types.

3. Synthèse / conclusions

L'absence de SMC n'a pas un effet majeur sur la ségrégation des chromosomes mais entraîne tout de même un délai de séparation après réplication, observé en microscopie, surtout pour les loci éloignés de *parS*. Par contre l'absence de SMC a un impact majeur sur la disposition du chromosome dans la cellule. Il y a en effet une perte de l'alignement des bras et de l'orientation longitudinale. Les bras sont alors très éloignés l'un de l'autre dans la cellule. La distance interfocale pour deux étiquettes, une sur chaque bras du chromosome, est en effet beaucoup plus grande en absence de SMC.

Par ailleurs il a été montré que SMC est responsable de l'alignement des bras du chromosome à partir du site *parS*. En effet lorsque ce site est déplacé, on observe une diagonale d'interaction inter-bras décalée selon la position du site *parS*. Cet alignement des bras par SMC est indépendant de la position du site *parS*, qu'il soit dans ou en dehors de la « zone de compétence ». Il a également été observé que l'alignement des bras de SMC pourrait devenir important dans le cas d'un *parS* déplacé sur le chromosome. En absence de SMC, les pourcentages de cellules anucléées sont en effet plus élevés dans les souches ayant un site *parS* déplacé.

La dernière partie de l'étude, consacrée à l'analyse de l'impact de la présence de 2 sites *parS* sur le chromosome, a permis de montrer que le *parS* le plus proche d'*oriC* n'est pas dominant ce qui aurait pu être imaginé du fait de l'hypothèse de la distance *oriC* – *parS*. Une hypothèse envisagée est que la distance entre les sites et par rapport à *oriC* soit importante pour la ségrégation dans le cas où il y a plusieurs *parS*. Dans la souche sauvage il y a 4 sites *parS* mais ils sont très proches et font certainement partie du même complexe nucléoprotéique formé par ParB lié à *parS*.

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Dans cette étude réalisée chez la bactérie *P. aeruginosa*, j'ai étudié deux aspects de la « biologie » du chromosome chez *P. aeruginosa* : la ségrégation des chromosomes et la conformation du chromosome dans la cellule.

1. Processus de ségrégation des chromosomes

1.1. Fixation de ParB sur le chromosome

Les séquences *parS* des systèmes de partition sont retrouvées en général dans les 15% du chromosome entourant *oriC* et sont en nombre variable selon les espèces. Des expériences de ChIP-seq chez *P. aeruginosa* ont indiqué que ParB se fixe sur 4 sites *parS* proches d'*oriC* (tous les 4 dans les 15kb à droite d'*oriC*). J'ai pu montrer qu'un seul des 4 sites *parS* est suffisant pour une ségrégation correcte des chromosomes. Cela a été observé dans les conditions de laboratoire, c'est-à-dire lorsque les bactéries sont cultivées dans des milieux favorables à leur croissance. *P. aeruginosa* est une bactérie pathogène opportuniste ubiquitaire capable de vivre dans de nombreux environnements différents. On peut donc supposer que les 4 sites *parS* soient nécessaires dans des conditions moins favorables. On peut par exemple imaginer qu'en condition de croissance très rapide où plusieurs copies du chromosome doivent être ségréguées, les 4 sites *parS* soient nécessaires, rendant peut-être le système de ségrégation plus robuste pour résister à ces conditions difficiles. Des études dans des milieux mimant ces conditions, pourraient permettre de tester cette hypothèse.

Les expériences de ChIP-seq réalisées montrent qu'il y a du « spreading » de ParB au niveau des 4 sites *parS* de *P. aeruginosa*. Chez *B. subtilis*, le « spreading » de ParB a aussi été observé et il a été montré qu'il serait nécessaire au recrutement de SMC par ParB lié au *parS* (Graham et al., 2014). On peut aussi imaginer un rôle similaire chez *P. aeruginosa*. L'observation de l'alignement des bras dans des mutants incapables de « spreading » pourra permettre de tester l'importance du « spreading » pour le chargement de SMC sur l'ADN.

ParB se fixe aussi moins fortement sur d'autres sites qui ne sont pas des séquences *parS* et aux niveaux desquels il n'y a pas de « spreading ». Les raisons et/ou les effets de cette fixation sont pour l'instant inconnus. La recherche de motifs pour ces sites de fixation montre qu'ils correspondraient à des moitiés de sites *parS*. L'un des sites identifié se situe dans la région promotrice de *dnaA*, gène codant la protéine d'initiation de la réplication, suggérant un rôle de régulation transcriptionnelle de ParB. Des résultats préalables du laboratoire montrent que pour une étiquette fluorescente placée à côté d'*oriC* chez un mutant Δ ParB il y a 17,7% de cellules ayant plus que deux foci par cellule contre 6,75% chez un mutant Δ parS1234. Ces deux mutants ont un pourcentage de cellules anucléées similaire. S'il y a un rôle de régulateur transcriptionnel de *dnaA* par ParB, on peut imaginer qu'en l'absence de ParB, *dnaA* soit plus exprimé, donc que la protéine soit produite en plus grande quantité. Il y aura alors plus d'initiation de la réplication. Chez un mutant Δ parS1234 la fixation de ParB sur *dnaA* pourrait se faire ce qui expliquerait la différence entre les deux mutants.

1. Processus de ségrégation des chromosomes

1. Processus de ségrégation des chromosomes

Pour tester cette hypothèse, on pourrait identifier et modifier le site de fixation de ParB sur *dnaA* pour empêcher la liaison de ParB sur ce site. On pourra alors regarder l'effet de cette mutation pour l'expression de *dnaA* et l'initiation de la réplication. On pourra aussi regarder l'effet de cette modification sur le pourcentage de cellules à plus de 2 foci chez un mutant Δ parB1234 et le comparer à celui du mutant Δ parB.

Le système ParABS régule l'activité de DnaA chez *B. subtilis* mais les mécanismes sont très différents.

Les autres sites secondaires de ParB ne sont pas situés dans des régions promotrices ou ne sont pas dans les gènes précédemment décrit comme régulé par ParB (Bartosik et al., 2014).

1.2. « Zone de compétence » de *parS*

Je me suis ensuite intéressée à l'importance de la position du site *parS* pour la ségrégation des chromosomes. En effet comme dit précédemment ces sites sont très souvent localisés proches de l'origine de réplication. Cette partie de mon projet avait donc pour but de savoir si cette proximité entre *oriC* et *parS* est importante et si oui pourquoi. Les résultats obtenus ont permis de délimiter une « zone de compétence » du *parS* dans laquelle le site peut être déplacé sans impact majeur sur le processus de ségrégation des chromosomes. Cette zone qui s'étend de -200 à +450kb autour d'*oriC* pourrait être déterminée par la distance *oriC-parS*. En effet, des analyses génétiques ont montré que le rapprochement d'une région contenant l'origine de réplication d'un *parS* localisé en dehors de la « zone de compétence », permettrait un processus de ségrégation correct via ce site *parS*. Cette hypothèse reste à confirmer notamment en réalisant un nouveau Tn-seq dans une souche ayant une origine de réplication déplacée. Si la distance *oriC-parS* est déterminante, la « zone de compétence » sera aussi déplacée dans cette souche. Si l'hypothèse de la distance *oriC-parS* n'est pas vérifiée, les séquences déterminantes qui permettent une ségrégation correcte par un *parS* en dehors de la « zone de compétence », pourront être recherchées, identifiées et caractérisées.

Chez *B. subtilis*, SMC recruté par ParB joue un rôle important dans la séparation après réplication des origines de réplication qui semble essentiel au bon déroulement du processus de ségrégation des chromosomes. En effet il a été montré dans des conditions de croissance rapide que lorsque SMC est absent, les origines répliquées ne se séparent pas et que cette non-séparation entraîne un défaut de ségrégation majeur. Si la réplication est ralentie dans ces mêmes conditions de croissance la séparation des origines peut avoir lieu en absence de SMC ce qui permet au processus de ségrégation des chromosomes de ce dérouler ensuite correctement (Gruber et al., 2014; Wang et al., 2014).

1. Processus de ségrégation des chromosomes

1. Processus de ségrégation des chromosomes

Afin de tester l'hypothèse selon laquelle l'éloignement d'un site *parS* d'*oriC* provoque un délai dans la séparation des origines après leur réplication, et que c'est ce délai qui pose problème, des tests de diminution de la vitesse de réplication à l'aide d'hydroxyurée pourront être réalisés. L'impact sur l'efficacité du processus de ségrégation lorsque le site *parS* est à 851kb à gauche d'*oriC* pourra alors être évalué. Si l'hypothèse est juste, il devrait y avoir une diminution du pourcentage de cellules anucléées lorsque la réplication est ralentie. Ensuite afin de comprendre pourquoi il est problématique qu'il y ait un délai entre la réplication et la ségrégation des *oriC*, les défauts de ségrégation observés lorsque *parS* est situé en dehors de la « zone de compétence » devront être caractérisés plus en détails notamment par de la vidéomicroscopie.

La « zone de compétence » de *parS* n'est pas symétrique par rapport à *oriC*. J'ai pu montrer dans cette étude que cela serait dû à la présence d'un opéron ribosomique à -220kb. Différentes hypothèses sont envisageables. D'abord il a déjà été observé chez *E. coli* que les opérons ribosomiques pourraient être localisés ensemble dans la cellule (Gaal et al., 2016) et que cette structure dite « nucleolus-like » nécessite la présence d'une région du promoteur des *rrn*. Chez *P. aeruginosa*, il y a 4 opérons ribosomiques et s'ils doivent être localisés ensemble dans la cellule, cela pourrait impacter la fonction du site *parS*. En effet si l'opéron ribosomique doit avoir une localisation particulière (avec les autres *rrn*), cela pourrait empêcher la transmission de la « force » du processus de ségrégation issue du site *parS* et créer un délai de ségrégation, même si *parS* n'est pas loin d'*oriC*. Une autre possibilité est que comme cela a été observé pour les limites des CIDs, la forte transcription de l'opéron ribosomique impacte la distance *oriC-parS*. En effet, la forte transcription pourrait augmenter la flexibilité locale de l'ADN et former une barrière topologique (Le and Laub, 2016) qui pourrait aussi impacter la transmission de la « force » du processus de ségrégation. Le déplacement soit de tout l'opéron, soit uniquement du promoteur qui pourrait être impliqué dans une colocalisation des *rrn*, et l'analyse de l'effet de ces déplacements sur la « zone de compétence » devraient permettre de confirmer ou d'infirmer les hypothèses.

En plus de jouer un rôle très important dans le processus de ségrégation, ParABS positionne aussi le chromosome dans la cellule. Les sites *parS* sont en effet localisés à 20 et 80 % de la longueur de la cellule en fin de ségrégation et en absence de *parS* l'alignement des bras est perdu.

1.3. Impact du déplacement d'un site *parS* sur le chromosome

L'analyse de l'effet du déplacement d'un site *parS* plus en détail pour deux positions chromosomiques distinctes a permis d'observer dans les deux cas que le déplacement de *parS* entraîne un repositionnement global du chromosome dans la cellule de telle façon que le site *parS* garde sa position cellulaire (à 20 et 80% de la longueur de la cellule). J'ai également montré que ce site est le site d'initiation de la ségrégation.

1. Processus de ségrégation des chromosomes

En effet en contexte sauvage les sites *parS* sont localisés à côté d'*oriC* sur le chromosome et la ségrégation se fait de façon symétrique depuis *parS* qui est localisé à côté d'*oriC*. Lorsque *parS* est déplacé, la ségrégation est symétrique par rapport à la nouvelle localisation du site *parS* et n'est donc plus symétrique par rapport à *oriC*.

Ce changement a aussi été observé par un décalage de l'alignement des bras du chromosome. Les bras sont en effet alignés à partir de la nouvelle position de *parS*. Le fait que *parS* soit toujours localisé à 20 et 80 % de la longueur de la cellule, quelle que soit sa position chromosomique suggère l'existence d'un mécanisme spécifique comme chez *C. crescentus* et *V. cholerae*. Chez *C. crescentus*, en contexte WT, il y a un site *parS* localisé à côté d'*oriC*. Un repositionnement du chromosome dans la cellule est aussi observé dans une souche dans laquelle une inversion éloigne *parS* à 400kb d'*oriC* (Toro et al., 2008). Le chromosome de cette bactérie est ancré au pôle via ParB lié au *parS* qui interagit avec la protéine PopZ. De même chez *V. cholerae*, lorsque les 3 sites *parS1* (en tandem) sont déplacés à 300kb ou 650kb d'*oriC* sur le chromosome 1, un repositionnement du chromosome est observé (sauf au niveau du *ter*) (David et al., 2014). Et il y a également un ancrage du chromosome 1 au pôle via HubP qui interagit avec ParA1 (Yamaichi et al., 2012). Il pourrait donc y avoir un ancrage chez *P. aeruginosa*, même si les positions finales de ségrégation sont à 20/80 % de la longueur de la cellule et donc pas tout à fait au pôle.

Un homologue de HubP nommé FimV est retrouvé chez *P. aeruginosa* mais cet homologue ne comporterait pas la région d'interaction avec ParA. Différentes expériences peuvent être envisagées pour rechercher les acteurs de cet ancrage potentiel. Tout d'abord des protéines interagissant avec ParA et ParB peuvent être recherchées par des techniques de biochimie comme le Tap-tag. Un crible génétique peut aussi être envisagé. Pour cela une banque de mutants serait réalisée à l'aide d'un transposon, les clones de petite taille (donc ayant un défaut de croissance) seraient d'abord sélectionnés et ensuite une fusion ParB-GFP permettra d'étudier la localisation de ParB dans ces souches et de faire une deuxième sélection de mutants (ceux dans lesquels ParB est mal localisé).

1.4. Impact de la présence de deux *parS* éloigné sur le chromosome

L'impact sur la ségrégation du chromosome de la présence de deux sites *parS* a aussi été étudiée. L'hypothèse de la distance *oriC-parS* pouvait suggérer que si un des *parS* est plus proche de l'origine de réplication, ce site soit dominant. Les résultats de microscopie pour l'initiation de la ségrégation et l'alignement des bras des chromosomes dans la cellule pour la souche $\Delta parS123 parS+552$ montrent que ce n'est pas le cas et que soit le site le plus loin d'*oriC* est dominant, soit aucun n'est dominant. Cela est aussi visible sur les matrices de contacts ou deux débuts de deuxièmes diagonales sont observés ce qui indique que le processus d'alignement des bras est initié au niveau des deux sites *parS* puis est interrompu. Les raisons de cette interruption restent à découvrir. Des analyses de microscopie plus approfondies seront nécessaires pour comprendre pourquoi la présence de deux *parS* peut-être problématique.

1. Processus de ségrégation des chromosomes

On peut imaginer que si l'initiation de la ségrégation se fait au niveau des deux sites *parS* dans la même cellule, il pourrait y avoir des collisions des complexes SMC (chargés au niveau de chaque site *parS*) ou que si la ségrégation est initiée à deux endroits cela soit problématique pour la localisation des deux copies après ségrégation (Un même copie pourrait être entraînée dans deux directions différentes).

Des expériences de 3C sur les souches ayant deux sites *parS* espacés sur le chromosome devraient permettre de déterminer les combinaisons qui permettent l'alignement complet des bras et de savoir si la distance entre les deux sites *parS* est limitante pour l'alignement des bras. L'analyse de plusieurs combinaisons de *parS* montre des pourcentages de cellules anucléées variables allant de 2 à 13%. Pour les sites placés à droite d'*oriC*, le pourcentage augmente avec la distance entre les deux sites *parS*. Même si les résultats ne sont pas aussi clairs pour les sites sur le bras gauche du chromosome la distance entre les sites pourrait être une explication. Dans la souche sauvage, il y a 4 sites *parS* proche d'*oriC*. Ces sites sont très proches l'un de l'autre (tous dans les 15kb à droite d'*oriC*) donc pourraient faire partie d'un même complexe nucléoprotéique avec ParB. A partir d'une certaine distance, 2 sites *parS* forment deux complexes nucléoprotéiques. L'étude de la distance à partir de laquelle 2 sites *parS* forment 2 complexes nucléoprotéiques et des défauts de ségrégation associés permettront de tester cette hypothèse.

Ces résultats montrent en tous cas un effet différent de la présence de deux *parS* sur le chromosome par rapport à ce qui est observé chez *B. subtilis* où 8 *parS* sont présents sur le chromosome dans les 20% autour d'*oriC*. En contexte sauvage, une seule diagonale est observée pour l'alignement des bras pour les 8 sites *parS* (Wang et al., 2015).

2. Conformation, disposition et positionnement du chromosome.

Un autre acteur du positionnement du chromosome dans la cellule est le complexe SMC-ScpAB et une autre partie de mon projet a été consacrée à l'étude du rôle de ce complexe dans l'organisation et la ségrégation du chromosome de *P. aeruginosa*. J'ai observé qu'en absence de SMC il n'y a pas de défaut majeur de ségrégation des chromosomes mais il y a un délai de séparation après réplication et surtout un effet majeur sur le positionnement du chromosome dont les bras ne sont plus alignés.

Des études plus approfondies notamment via des ChIP-seq et des expériences de HI-C chez *B. subtilis* ont montré que SMC serait recruté au niveau des sites *parS* et se déplacerait (processus de translocation des bras) ensuite sur le chromosome jusqu'au terminus, ce qui conduit à l'alignement des bras du chromosome (deuxième diagonale sur la matrice) (Wang et al., 2017). Nos résultats montrent que malgré les différences phénotypiques entre ces deux espèces, chez *P. aeruginosa* aussi la diagonale secondaire est absente dans un mutant Δsmc .

2. Conformation, disposition et positionnement du chromosome.

2. Conformation, disposition et positionnement du chromosome.

Ces résultats indiquent que comme chez *B. subtilis*, ParB lié au *parS* chargerait SMC sur le chromosome permettant l'alignement des bras du chromosome. Cependant beaucoup d'études sont encore nécessaires concernant ce complexe SMC, pour comprendre son rôle et son fonctionnement chez *P. aeruginosa*. Des expériences complémentaires seront nécessaires pour mieux comprendre comment SMC est chargé sur le chromosome et aligne ensuite les bras du chromosome. Des cinétiques en 3C-seq sur le chromosome devraient permettre de savoir comment SMC favorise l'alignement des bras du chromosome. Des études de mutants des différents domaines de SMC c'est à dire le domaine « head » ATPase, le « coiled-coil » ou le domaine « hinge » permettront de mieux comprendre comment SMC est chargé sur le chromosome et quelles sont les différentes conformations de SMC impliquées à chaque étape.

De façon plus générale, le mécanisme de recrutement et déplacement de SMC sur le chromosome semble conservé entre les bactéries. Le mécanisme de translocation de SMC n'est pas connu et reste à étudier et les variations entre les espèces restent à comprendre.

3. Originalité du modèle

Comme évoqué dans l'introduction, la souche de PAO1 étudiée au laboratoire comporte une délétion au niveau de l'opéron MksBEF, deuxième complexe condensine présent chez *P. aeruginosa*. Récemment au laboratoire, dans le but d'étudier le rôle de MksBEF dans la ségrégation du chromosome, les gènes *mksBEF* ont été reconstitués. La matrice de contacts obtenue en 3C-seq sur la souche PAO1 contenant MksBEF et ne contenant pas SMC-ScpAB montre qu'il y a plus d'interactions à longues distances comme c'est le cas pour MukBEF chez *E. coli* (Lioy et al, under review). Il a également été observé que lorsque MksBEF est présent dans la cellule, le défaut de ségrégation lié à l'absence du système ParABS est compensé. Le pourcentage de cellules anucléées passe ainsi de 20% à 3% en présence de MksBEF. Par contre MksBEF ne permet pas de rétablir un positionnement du chromosome WT en absence de ParABS selon l'étude du positionnement cellulaire d'une étiquette fluorescente proche d'*oriC*. Ces résultats préliminaires semblent indiquer que MksBEF aurait un rôle dans la ségrégation du chromosome mais pas dans sa conformation. Les deux condensines bactériennes présente chez *P. aeruginosa* auraient donc chacune leur rôle, l'une plutôt dans l'organisation du chromosome, l'autre dans la ségrégation des chromosomes.

Les condensines et les systèmes de partition sont conservés entre les bactéries. ParB est en effet présent dans 70% des bactéries et les condensines sont retrouvées dans la plupart des organismes eucaryotes comme procaryotes. Comme c'est le cas de *P. aeruginosa* certaines bactéries possèdent plusieurs condensines bactériennes. L'exemple de *P. aeruginosa* montre que si plusieurs condensines sont présentes, elles n'ont pas forcément le même rôle ni le même fonctionnement. L'absence des deux condensines peut être supportée en présence de ParABS.

2. Conformation, disposition et positionnement du chromosome.

2. Conformation, disposition et positionnement du chromosome.

Des études supplémentaires seront nécessaires pour comprendre leurs actions exactes et le lien entre les différents systèmes impliqués dans la ségrégation en fonction des différentes combinaisons existantes (présence ou non de ParABS, une ou plusieurs condensines bactériennes, de la même famille ou de familles différentes).

En plus d'être un très bon modèle pour l'étude du lien *oriC-parS*, *P. aeruginosa* est donc un modèle idéal pour l'étude de l'action de 2 condensines sur une même molécule d'ADN.

2. Conformation, disposition et positionnement du chromosome.

MATERIEL ET METHODES

1. Matériels

1.1. Milieux :

Deux types de milieux sont utilisés dans cette étude :

- Un milieu riche LB (Lysogenic Broth), qui contient du tryptone (source d'acide aminé et de caséine, 10g/L), du Yeast Extract (5g/L) contenant des vitamines essentielles, et du chlorure de sodium NaCl (5g/L) comme source de sel. Les antibiotiques nécessaires sont ajoutés en fonction des expériences (pour *E. coli*, G418 à 25µg/mL et carbenicilline 100µg/mL; pour *P. aeruginosa* gentamycine 10µg/mL et carbenicilline 300µg/mL). Les Tn-seq sont réalisés avec des boîtes de Petri contenant du LB.
- Du milieu minimum (MM, 7g PO₄K₂H; 2g PO₄H₂K; 0,6g TriNA Citrate; 0,1g MgSO₄; 1g (NH₄)₂SO₄ pour 1L de 2x) supplémenté soit avec du citrate 0,25%, soit avec du glucose 0.2% et des casaminoacides 0,12% (GC), comme sources de carbone et d'énergie pour la bactérie. Les CHIP et les expériences de microscopie sont réalisés en MM Citrate. Le suivi de la croissance et le dénombrement de cellules anucléées sont effectués en MM GC. Les expériences de 3C-seq sont réalisées en MM citrate sauf pour la phase stationnaire réalisée en MMGC (La souche WT en contrôle aussi).

1.2. Souches :

Toutes les souches utilisées dans ce travail sont des dérivées de la souche sauvage PAO1 de *P. aeruginosa*. La liste des souches utilisées ne faisant pas parties de *lagage et al* 2016 est en annexe.

Trois types de cellules compétentes d'*E. coli* ont été utilisés pour la construction des souches :

- DH5alpha (Invitrogen) utilisées pour le clonage.
- β2163 (Demarre et al. 2005), auxotrophe pour l'acide diaminopimélique (DAP) souche donneuse pour les conjugaisons.
- MFPpir, auxotrophe pour l'acide diaminopimélique (DAP), souche donneuse pour la transposition dans les expériences de tn-seq.

1.3. Plasmides :

Pour la construction des souches, différents types de plasmides, disponibles au laboratoire, ont été utilisés.

- Les plasmides de type pEXG2 (Rietsch et al., 2005) qui contiennent le gène *sacB*, qui rend la présence de sucrose toxique, et un gène de résistance à la gentamycine. Ce type de plasmide permet d'introduire des modifications (délétion-insertion) grâce à deux événements de recombinaisons homologues successifs.
- Les plasmides de type pP30 Δ (Rietsch et al., 2005) qui portent le même marqueur que le pEXG2 mais ne contiennent pas le gène *sacB*. Ils permettent l'insertion de séquences par 1 seul événement de recombinaison homologue. Par contre il porte deux sites FRT spécifiquement reconnus par la flipase, ce qui permet l'excision du fragment d'ADN situé entre les deux sites FRT (La résistance à la gentamycine dans le cas du pP30 Δ).

Les plasmides de type pEXG2 et pP30 Δ sont non répliatifs chez *P. aeruginosa*.

- Le plasmide pFLP2, répliatif chez *P. aeruginosa* (Hoang et al. 1998) contenant le gène codant la flipase, le gène *sacB* et une résistance à la carbenicilline.
- Le plasmide pPSVbicolorAp, plasmide portant les gènes codants les protéines ParBT1-YFP et TetR-CFP et une résistance à la carbenicilline
- Le plasmide pSC189GM et pSC189GM-*parS3* (Chiang and Rubin, 2002) vecteur pour les expériences transposition suivie d'un séquençage haut-débit (Tn-seq). Ce contient la transposase C9, un transposon Mariner contenant la résistance à la gentamycine et contenant ou non un site *parS*, une résistance à l'ampicilline.

La liste des plasmides utilisés est en annexe.

2. Méthodes

2.1. Construction des souches :

Pour chaque souche les mutations chromosomiques sont introduites par conjugaison entre une souche donneuse (souche β 2163 contenant le plasmide permettant les modifications génétiques) et une souche receveuse (PAO1 ou dérivées). Les cellules de la souche β 2163 sont auxotrophes pour le DAP ce qui permet de les contre sélectionner facilement.

Ainsi pour construire un mutant de délétion, un fragment comprenant les 500pb en amont et les 500pb en aval de la séquence à déléter est clonée dans un plasmide de type pEXG2. Ce plasmide est conjugué (via la souche donneuse β 2163) dans la souche PAO1 ou dérivée de PAO1 dans laquelle on souhaite introduire la mutation. Le premier événement de recombinaison est sélectionné sur gentamycine 10 μ g/mL. Les cellules sont ensuite retriées sur sucrose pour sélectionner le deuxième événement de recombinaison (excision du plasmide portant le gène *sacB* qui rend la présence de sucrose toxique). La mutation obtenue étant non marquée.

Dans le cas de l'insertion des étiquettes spécifiques pour la microscopie, de l'insertion des séquences codant les versions étiquetées de ParB ou SMC, et de la réinsertion de site *parS* dans les souches mutantes, des plasmides de type pP30 Δ sont utilisés. La séquence à insérer a d'abord été clonée dans le pP30 Δ . Puis environ 600 pb correspondant à la séquence d'homologie ou l'on souhaite insérer la séquence d'intérêt ont été clonées en amont de celle-ci. Les régions d'homologies choisies sont de préférences des régions inter-géniques n'étant pas à proximité de gènes essentiels. L'insertion de ces plasmides par recombinaison homologue est sélectionnée après conjugaison sur LB + gentamycine 10mg/mL. Afin de réaliser deux insertions successives, le plasmide pFLP2 portant la séquence codant la flippase (qui permet l'excision du gène codant la résistance à la gentamycine par recombinaison entre les deux sites FRT) est introduit dans les cellules par électroporation. Une sélection sur carbenicilline est effectuée. La perte du plasmide pFLP2 est ensuite sélectionnée sur LB + sucrose 5%. Une deuxième étiquette peut alors être insérée à une autre position chromosomique de la même manière.

Toutes les insertions sont vérifiées par PCR en utilisant des oligonucléotides spécifiques.

2.2 Suivi de la croissance au cours du temps.

Les courbes de croissance sont réalisées en mesurant la densité optique d'une culture au cours du temps. Pour cela une culture de nuit est diluée à DO=0,01 dans du MM citrate ou MM GC et cultivée à 30°C. A partir de deux heures de culture, 1mL est prélevé toute les demi-heures et la densité optique est mesurée avec un spectrophotomètre. A partir de ces courbes, le temps de génération moyen peut être estimé. Sur le graphique représentant la croissance en échelle logarithmique on peut déterminer le coefficient directeur de la droite correspondante à la phase exponentielle (courbe de tendance).

Ce coefficient correspond au taux de croissance népérien. Le temps de génération (temps de multiplication par 2 de la population) peut alors être estimé en calculant $\text{LN}(2)/\text{taux de croissance népérien}$.

2.3 Marquage des cellules et coloration DAPI :

Un marquage au DAPI permet la détection de défaut de ségrégation. Le DAPI est un intercalant fluorescent de l'ADN permettant de repérer le nucléoïde dans les cellules. Si une souche présente un défaut de ségrégation, certaines cellules ne contiendront pas d'ADN, donc ne seront pas marquées au DAPI (cellules anucléées).

A partir d'une culture de nuit, la souche d'intérêt est diluée ($DO=0,01$) et cultivée dans 10mL de MM GC, jusqu'à $DO=0.2-0.25$. 0,5mL de culture est ajouté à un volume équivalent d'un mélange contenant 5% de formaldéhyde et 0,25% de para-formaldéhyde, et agité 20 minutes à 4°C pour fixer les cellules. Après deux lavages au PBS 1X (PBS 10x : NaCl 1.4M, KCl 26.8mM, Na_2HPO_4 64.6mM, KH_2PO_4 11.48mM), les cellules sont incubées 10 min dans 0.5mL de GTE/DAPI (GTE : Glucose 50mM, Tris pH8 20mM, EDTA 10mM ; DAPI 1mg/mL), puis lavées avec 1mL de PBS 1X. Elles sont ensuite déposées sur des lames de microscope (Poly Prep slides de SIGMA-ALDRICH) recouvertes d'une couche PBS 1x agarose 1%. Le marquage est alors observé au microscope Leica DM6000 avec le logiciel Metamorph.

2.4. Etude de la position cellulaire du chromosome par microscopie.

Le positionnement du chromosome dans la cellule, a été observé par microscopie à fluorescence. Pour cela deux systèmes de FROS (Fluorescence Repressor-Operator System) sont utilisés. D'une part des séquences *tetO* spécifiquement reconnues par la protéine TetR sont insérées et d'autre part des séquences *parS*^{*pMT1*} spécifiquement fixées par la protéine ParB du plasmide pMT1 de *Yersinia Pestis* (ParBT1) (ce système n'ayant pas d'influence sur le système ParABS de *P. aeruginosa*). Les protéines fluorescentes YFP et CFP sont respectivement fusionnées à ParBT1 (dans sa partie N-terminale) et à TetO (dans sa partie C-terminale). En suivant la position des foci fluorescents dans la cellule on peut donc suivre la position cellulaire des loci chromosomiques portant les séquences spécifiques. Les gènes codant les deux protéines sont portés par un même plasmide (qu'il faut donc introduire dans la souche par électroporation) et sont placés sous le contrôle d'un promoteur inductible à l'IPTG.

Une culture de nuit est diluée au $1/300^{\text{ème}}$ dans 3mL de MM citrate contenant de l'IPTG 0.5 mM pour induire l'expression des protéines fluorescentes. Environ 6h plus tard à 30°C (ce qui correspond à une DO entre 0,08 et 0,12), 1mL de culture est centrifugé et le culot est déposé sur une lame de microscope recouverte d'une couche de PBS agarose 1%. Une vingtaine de photos par souche sont analysées à l'aide du logiciel Microbetracker (Matlab) (Sliusarenko et al. 2011). Les cellules et les spots de fluorescence sont repérés par le logiciel, et la distance par rapport au pôle est mesurée (en orientant les cellules par rapport à l'étiquette du Ter).

2.5. Immunoprécipitation de la chromatine (ChIP).

Cette technique a pour but d'identifier les sites de fixation d'une protéine par fixation des liaisons entre la protéine et ces séquences cibles, puis fragmentation de l'ADN et immunoprécipitation. Pour réaliser cette expérience, le gène *parB* a été modifié pour coder une version étiquetée (3xFLAG) de la protéine ParB. L'intégration de cette étiquette permettra de réaliser l'immunoprécipitation avec un anticorps anti-3xFLAG (anticorps commercial). Il a déjà été vérifié que cette étiquette ajoutée à ParB n'affecte pas la fonctionnalité de la protéine.

Cent cinquante mL de MM citrate ont été inoculés au $1/200^{\text{ème}}$ à partir d'une culture de nuit en LB. Lorsque la culture atteint une D.O. d'environ 0,15, les liaisons entre l'ADN et les protéines sont fixées (crosslink) avec 1% de formaldéhyde. Après 30 min d'incubation à température ambiante, la réaction est stoppée par ajout de glycine à 0.175 M pendant 10min. Deux lavages sont ensuite effectués avec 10mL de PBS 1x. Afin de lyser les cellules, le culot est resuspendu dans 1mL de tampon de lyse (50mM Tris HCL pH 7.4 ; 150mM NaCl ; 1mM EDTA; Triton X-100 1% ; anti-protéase (cOmpleteTM Protease Inhibitor Cocktail Tablets EDTA-Free ROCHE)). Les cellules sont lysées et l'ADN fragmenté par sonication. L'échantillon est alors centrifugé pour faire tomber les cellules non lysées et le surnageant est récolté (50µL de surnageant sont par ailleurs mis de côté comme contrôle avant immunoprécipitation (Input) et 10µL pour un Western Blot pour vérifier la présence de la protéine) et incubé toute la nuit avec des billes d'agarose couplées à l'anticorps anti 3xFLAG (ANTI-FLAG[®] M2 Affinity Gel (A2220 SIGMA-ALDRICH)). Le lendemain deux nouveaux lavages sont effectués dans du TBS 1x + Tween 0,05% puis trois autres dans du TBS 1x. Les échantillons sont ensuite élués, à l'aide de peptide 3xFLAG (5µg/µL, Sigma). Les échantillons élués ainsi que les inputs (après ajout de 200µL de TBS) sont placés à 65°C toute la nuit pour reverser le crosslink. L'ADN est ensuite purifié avec le kit QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen).

L'ADN des échantillons élués est quantifié avec le Qubit[®] 2.0 Fluorometer (en utilisant le kit de marquage dsDNA HS Assay Kits) permettant de détecter de 0,2 à 100ng d'ADN double brin. Les Inputs, qui contiennent plus d'ADN car ils sont prélevés avant immunoprécipitation, ont été quantifiés au NanoDrop 2000C spectrophotometer (Thermo Scientific). Des PCR (de 25 cycles pour ne pas être en conditions saturantes) peuvent alors être utilisées pour étudier la fixation de la protéine dans une région précise. Un séquençage haut débit permet lui d'identifier tous les sites de fixation de la protéine étudiée (ParB dans notre cas). Les profils de densité issus du séquençage peuvent être visualisés sur le site Web de l'UCSC Genome Browser. Les pics alors visibles représentent une région enrichie dans l'échantillon immunoprécipité, et donc un site de fixation potentiel de la protéine sur laquelle est réalisée le ChIP.

Afin d'identifier ces régions particulièrement enrichies, des fonctions spécifiques ont été développées sous Matlab par Ludovic Lechat (postdoc dans l'équipe Espéli). Ces fonctions permettent de calculer le ratio Eluat/Input pour toutes les régions du génome, et d'identifier les pics correspondants à des régions présentant un enrichissement donné (dans notre cas, au minimum de 10).

2.6 Transposition suivie d'un séquençage haut-débit (Tn-seq)

Pour réaliser les transpositions, les plasmides pSC189Gm et pSC189Gm-*parS* sont transformés dans une souche donneuse MFPpir. Cette souche donneuse et la souche receveuse (Δ *parS*1234) sont conjuguées sur des boîtes de Pétri. A partir de boîtes placées toute la nuit à 37 degrés pour la souche donneuse et à 42 degrés pour la souche receveuse, les deux souches sont reprises dans du LB pour qu'elles aient une D.O. de 40 pour la souche donneuse et 20 pour la souche receveuse. Des volumes équivalents des deux souches sont ensuite mélangés et des gouttes de 50 μ L de ce mélange sont déposés sur des boîtes de Pétri contenant du LB et du DAP (0,3mM) (SigmaD1377) qui sont incubées toute la nuit pour transposition et sélection. Le mélange de souches transposées est ensuite récupéré, repris dans 100 μ L de LB par transposition puis étalé sur des boîtes contenant du milieu Pseudomonas Isolation Agar (PIA) (Sigma17208) contenant 60 μ g.mL de gentamycine (Sigma G1397). Les colonies obtenues sont ensuite récupérées, un lavage avec du LB est effectué puis les cellules sont congelées à -80°C en 5 aliquots.

L'ADN génomique est ensuite préparé à partir d'un aliquots. Il est extrait des cellules, puis est fragmenté en utilisant le Covaris S220 en fragment d'environ 300bp. Les extrémités sont ensuite réparées, et des étapes de PCR permettent d'amplifier les fragments d'ADN contenant le transposon, et de lier les adaptateurs nécessaire au séquençage Illumina. Le séquençage est effectué par la plateforme IMAGIF (I2BC, Gif-sur-Yvette). Les séquences sont ensuite alignées sur le génome reconstitué de PAO1 pour déterminer les sites d'insertion du transposons à l'aide de l'outil Bowtie. Des fonctions MATLAB et le logiciel Artemis permettent ensuite d'analyser les résultats. Les ratios du nombre d'insertion avec ou sans *parS* sont calculés et les log2 de ces ratios sont ensuite calculés pour améliorer la représentation et les résultats sont présentés en bin de 10kb.

2.7 Capture de conformation chromosomique (3C-seq)

Ces expériences ont été réalisées par Virginia Lioy

Protocole extraits de “functional partition of a bacterial chromosome through the interplay of nucleoid-associated proteins and condensing” Lioy VS, Cournac A, Marbouty M, Duigou S, Mozziconacci J, Espeli O, Boccard F, Koszul R, under review.

Génération des bibliothèques de 3C

Les bibliothèques de 3C sont générées comme décrit dans (Marbouty et al., 2015). 100 ml de culture sont fixés avec du formaldéhyde (préparé fraîchement) pendant 30 minutes (7% en concentration finale) à température pièce (RT) puis 30 minutes à 4°C. La réaction est ensuite stoppée en ajoutant de la glycine (concentration finale 0,25 M) pendant 20 minutes à 4°C. Les cellules fixées sont ensuite centrifugées, et les culots sont congelés dans de la carboglace et stockés à -80°C jusqu'à utilisation. Les culots sont alors décongelés dans la glace, resuspendus dans du TE (600µL, Tris 10 mM EDTA 0,5mM, pH 8) avec 4µL de lysozyme (35U/µL ; Tebu Bio) et incubé à température pièce pour 20 minutes. Du SDS est ajouté au mix (concentration finale 0,5%) et les cellules sont incubées pour 10 minutes à température pièce. 50µL de cellules lysées sont transférées dans 8 tubes contenant 450µL de mix de digestion (1X NEB 1 buffer, 1% triton X-100, and 100U HpaII enzyme). L'ADN est digéré pendant 3h à 37°C, séparés en 4 aliquots et dilué dans 8mL de tampon de ligation (1X tampon ligation NEB sans ATP, 1mM ATP, 0,1mg/mL BSA, 125 Units de T4 DNA ligase 5U/µL). La ligation est effectuée à 16°C pendant 4h, suivie d'une incubation sur la nuit à 65°C en présence de protéinase K à 250µg/ml et de l'EDTA 5 mM. L'ADN est ensuite précipité avec un volume équivalent de Na-Acetate 3M (pH 5.2) et deux volumes d'iso-propanol. Après 1h à -80°C, l'ADN est centrifugé, puis les culots resuspendus dans 500µL de tampon TE 1X et incubés 30 minutes à 37°C en présence de RNase A (0,03 mg/ml). L'ADN est ensuite centrifugé dans des colonnes de 2mL et extrait deux fois avec 500µL de phénol-chloroforme pH 8.0, précipité, lavé avec 1mL d'éthanol froid 70% et dilué dans 30µL de TE. Tous les tubes sont regroupés et la bibliothèque de 3C résultante est quantifiée sur gel en utilisant un QuantityOne software (BioRad)

Réalisation des bibliothèques pour le séquençage Illumina

5µg des bibliothèques de 3C sont resuspendus dans de l'eau (volume final 130µL) et fragmenté en utilisant un Covaris S220 (Duty cycle 5, Intensity 5, cycles/burst 200, time 60 sec for 4 cycles). L'ADN est purifié et un kit est ensuite utilisé (Paired-End DNA sample Prep Kit – Illumina – PE-930-1001) avec pour seul changement dans les instructions que l'ADN a été ligué à des adaptateurs spécifiques pendant 4h à température pièce. Les tubes sont ensuite incubés à 65°C pour 20 minutes. Les fragments d'ADN allant de 400 à 900pb sont ensuite purifiés en utilisant un PippinPrep (SAGE Science). Pour chaque bibliothèque, 4 tests PCR sont réalisés pour déterminer le nombre optimal de cycles PCR. Une PCR à grande échelle (8 réactions) est alors réalisée avec le nombre de cycle déterminés précédemment. Les produits de PCR est finalement purifié avec un kit Qiagen MinElute et séquéncé en utilisant un séquenceur illumina (HiSeq2000, HiSeq2500 or NextSeq, paired-end).

Analyse des données/génération des matrices de contacts

Une fois récupéré, les adaptateurs sont retirés des données issues du séquençage et les « reads » sont alors alignés sur le génome de la souche PAO1 de *P. aeruginosa* en utilisant Bowtie 2. Une procédure itérative est ensuite appliquée : Les premières 20pb de chaque read sont d'abord alignées et la longueur de l'alignement est ensuite augmentée progressivement. Chaque « read » est assigné à un fragment de restriction. Les reads non informatifs, comme les fragments non coupés ou colinéaires ont été retirés puis les matrices de contacts correspondantes sont générées et normalisées via le Sequential Component Normalization procedure (SCN; (Cournac et al., 2012). Pour visualiser la matrice de contacts un exposant ($^{0.2}$) est appliqué au matrices normalisées.

Error! Use the Home tab to apply Titre 1 to the text that you want to appear here.

ANNEXES

Liste des souches

VLB27	PAO1 Δ SMC parST1 PA2127 (3,090-L) post pFLP2 tetO PA0069 (82-R) + pPSVbicolorAp	Cette étude
VLB28	PAO1 Δ SMC parST1 PA2127 (3,090-L) post pFLP2 tetO PA0290 (327-R), pPSVbicolorAp	Cette étude
VLB29	PAO1 Δ SMC parST1 PA2127 (3,090-L) post pFLP2 tetO PA0572 (572-R) + pPSVbicolorAp	Cette étude
VLB30	PAO1 Δ SMC parST1 PA2127 (3,090-L) post pFLP2 tetO PA4027 (1,006-R), pPSVbicolorAp	Cette étude
VLB31	PAO1 Δ SMC parST1 PA2127 (3,090-L) post pFLP2 tetO PA4457 (1,275-L), pPSVbicolorAp	Cette étude
VLB32	PAO1 Δ SMC parST1 PA2127 (3,090-L) post pFLP2 tetO PA4822 (851-L) + pPSVbicolorAp	Cette étude
VLB33	PAO1 Δ SMC parST1 PA2127 (3,090-L) post pFLP2 tetO PA5126 (488-L) + pPSVbicolorAp	Cette étude
VLB34	PAO1 Δ SMC parST1 PA2127 (3,090-L) post pFLP2 tetO PA5480 (92-L) + pPSVbicolorAp	Cette étude
VLB83	PAO1 Δ SMC parsT1 PA2910 (2,250-R) + pPSVbicolorAP	Cette étude
VLB84	PAO1 Δ SMC parsT1 PA2258 (3,028-R) + pPSVbicolorAP	Cette étude
VLB85	PAO1 Δ SMC parsT1 PA3573 (1,509-R) + pPSVbicolorAP	Cette étude
VLB86	PAO1 Δ SMC parsT1 PA1428 (2,302-L) + pPSVbicolorAP	Cette étude
VLB87	PAO1 Δ SMC parsT1 PA4027 (1,006-R) + pPSVbicolorAP	Cette étude
VLB88	PAO1 Δ SMC parsT1 PA4457 (1,275-L) + pPSVbicolorAP	Cette étude
VLB89	PAO1 Δ SMC parsT1 PA5480 (92-L) + pPSVbicolorAP	Cette étude
VLB103	PAO1 Δ SMC parsT1 PA0981 (1,812-L) + pPSVbicolorAP	Cette étude
VLB104	PAO1 Δ SMC parsT1 PA2666 (2,499-R) + pPSVbicolorAP	Cette étude
VLB105	PAO1 Δ SMC parsT1 PA4822 (851-L) + pPSVbicolorAP	Cette étude
VLB112	PAO1 Δ SMC parsT1 PA1643 (2,538-L) + pPSVbicolorAP	Cette étude
VLB113	PAO1 Δ SMC parsT1 PA572 (628-R) + pPSVbicolorAP	Cette étude
VLB114	PAO1 Δ SMC parsT1 PA2319 (2,957-R) + pPSVbicolorAP	Cette étude
VLB115	PAO1 Δ SMC parsT1 PA0290 (327-R) + pPSVbicolorAP	Cette étude
VLB116	PAO1 Δ SMC parsT1 PA3133 (2,000-R) + pPSVbicolorAP	Cette étude
VLB117	PAO1 Δ SMC tetO PA3133 (2,000-R) + pPSVbicolorAP	Cette étude
VLB118	PAO1 Δ SMC parsT1 PA2523 (2,672-R) + pPSVbicolorAP	Cette étude
VLB123	PAO1 Δ SMC tetO PA1874 (2,784-L) + pPSVbicolorAP	Cette étude
VLB124	PAO1 Δ SMC tetO PA5126 (488-L) + pPSVbicolorAP	Cette étude
VLB125	PAO1 Δ SMC parsT1 PA5126 (488-L) + pPSVbicolorAP	Cette étude
VLB138	PAO1 Δ SMC parsT1 PA4027 (1,006-R) tetO PA4457 (1,275-L) + pPSVbicolorAP	Cette étude
VLB143	PAO1 Δ SMC parsT1 PA3573 (1,509-R) tetO PA0981 (1,812-L) + pPSVbicolorAP	Cette étude
VLB145	PAO1 Δ SMC parsT1 PA0981(1,812-L) tetO PA4027 (1,006-R) + pPSVbicolorAP	Cette étude
VLB146	PAO1 Δ SMC parsT1 PA3573 (1,509-R) tetO PA4457 (1,275-L) + pPSVbicolorAP	Cette étude
VLB213	PAO1 Δ SMC parsT1 PA0290 (327-R) + tetO PA5126 (488-L) + pPSVbicolorAP	Cette étude
VLB214	PAO1 Δ SMC parsT1 PA2523 (2,672-R) + tetO PA1874 (2,784-L) + pPSVbicolorAP	Cette étude
VLB96	Δ pars1234 + pars2 (552-R) parsT1 PA0069 (82-R) + pPSVbicolorAP	Cette étude
VLB97	Δ pars1234 + pars2 (552-R) parsT1 PA2910 (2,250-R) + pPSVbicolorAP	Cette étude
VLB98	Δ pars1234 + pars2 (552-R) parsT1 PA0290 (327-R) + pPSVbicolorAP	Cette étude
VLB99	Δ pars1234 + pars2 (552-R) parsT1 PA4027 (1,006R) + pPSVbicolorAP	Cette étude
VLB100	Δ pars1234 + pars2 (552-R) parsT1 PA2319 (2,957-R) + pPSVbicolorAP	Cette étude
VLB101	Δ pars1234 + pars2 (552-R) parsT1 PA2523 (2,499-R) + pPSVbicolorAP	Cette étude
VLB107	Δ pars1234 + pars2 (552-R) parsT1 PA3133 (2,000-R) + pPSVbicolorAP	Cette étude
VLB119	Δ pars1234 + pars2 (552-R) tetO PA1874 (2,784-L) avant pFLP2 + pPSVbicolorAP	Cette étude
VLB120	Δ pars1234 + pars2 (552-R) tetO PA2666 (2,499-R) avant pFLP2 + pPSVbicolorAP	Cette étude

VLB121 Δ pars1234 + pars2 (552-R) tetO PA0981 (1,812-L) avant pFLP2 + pPSVbicolorAP	Cette étude
VLB122 Δ pars1234 + pars2 (552-R) parsT1 PA0981 (1,812-L) avant pFLP2+ pPSVbicolorAP	Cette étude
VLB126 Δ pars1234 + pars2 (552-R) parsT1 PA3573 (1,509-R) + pPSVbicolorAP	Cette étude
VLB129 Δ pars1234 + pars2 (552-R) parsT1 PA2910 (2,250-L) post pFLP2 tetO PA4457 (1,275-L) + pPSVbicolorAP	Cette étude
VLB130 Δ pars1234 + pars2 (552-R) parsT1 PA3573 (1,509-R) post pFLP2 tetO PA5126 (488-L) + pPSVbicolorAP	Cette étude
VLB131 Δ pars1234 + pars2 (552-R) parsT1 PA3573 (1,509-R) post pFLP2 tetO PA4457(1,275-L)+ pPSVbicolorAP	Cette étude
VLB132 Δ pars1234 + pars2 (552-R) parsT1 PA0981 (1,812-L) post pFLP2 tetO PA3573 (1,509-R)+ pPSVbicolorAP	Cette étude
VLB140 Δ pars1234 + pars2 (552-R) parsT1 PA0069 (82-R) post pFLP2 tetO PA0572 (628-R) + pPSVbicolorAP	Cette étude
Δ pars1234 + pars2 (552-R) parsT1 PA0290 (327-R) + pPSVbicolorAP	Cette étude
Δ pars1234 + pars2 (552-R) parsT1 PA2319 (2,957-R) + pPSVbicolorAP	Cette étude
IVGB567.1 pars1234 + pars2 (552-R) Δ smc	Cette étude
VLB147 PAO1 Δ 3parS parST1 PA290 (327-R) + pPSVbicolorAP	Cette étude
VLB148 PAO1 Δ 3parS parST1 PA0572 (628-R) + pPSVbicolorAP	Cette étude
VLB149 PAO1 Δ 3parS parST1 PA3133 (2,000-R) + pPSVbicolorAP	Cette étude
VLB150 PAO1 Δ 3parS parST1 PA3573 (1,509-R) + pPSVbicolorAP	Cette étude
VLB151 PAO1 Δ 3parS parST1 PA2910 (2,250-R) + pPSVbicolorAP	Cette étude
VLB152 PAO1 Δ 3parS parST1 PA2523 (2,499-R)+ pPSVbicolorAP	Cette étude
VLB153 PAO1 Δ 3parS parST1 PA2258 (3,028-R) + pPSVbicolorAP	Cette étude
VLB154 PAO1 Δ 3parS parST1 PA2666 (2,499-R) + pPSVbicolorAP	Cette étude
VLB155 PAO1 Δ 3parS parST1 PA4027 (1,0006-R) + pPSVbicolorAP	Cette étude
VLB183 PAO1 Δ 3parS parST1 PA0069 (82-R) + pPSVbicolorAP	Cette étude
VLB184 PAO1 Δ 3parS parST1 PA5480 (92-L) + pPSVbicolorAP	Cette étude
VLB185 PAO1 Δ 3parS parST1 PA2127 (3,090-L) + pPSVbicolorAP	Cette étude
VLB195 PAO1 Δ 3parS parST1 PA4457 (1,275-L) + pPSVbicolorAP	Cette étude
VLB196 PAO1 Δ 3parS parST1 PA4822 (851-L) + pPSVbicolorAP	Cette étude
VLB197 PAO1 Δ 3parS parST1 PA1643 (2,538-L) + pPSVbicolorAP	Cette étude
VLB198 PAO1 Δ 3parS parST1 PA1428 (2,302-L) + pPSVbicolorAP	Cette étude
VLB215 PAO1 Δ 3parS parST1 PA2258 (3,028-R) + pPSVbicolorAP	Cette étude
VLB216 PAO1 Δ 3parS parST1 PA2319 (2,957-R) + pPSVbicolorAP	Cette étude
VLB217 PAO1 Δ 3parS parST1 PA0981 (1,812-L) + pPSVbicolorAP	Cette étude
VLB218 PAO1 Δ 3parS tetO PA1874 (2,784-L) + pPSVbicolorAP	Cette étude
VLB219 PAO1 Δ 3parS tetO PA5126 (488-L) + pPSVbicolorAP	Cette étude
VLB259 PAO1 Δ 3parS parST1 PA5480 (92-L) + tetO PA0572 (628-R) + pPSVbicolorAP	Cette étude
VLB137 PAO1 Δ pars123 + pars2 (552-R) pPSVbicolorAP	Cette étude
VLB167 PAO1 Δ pars123 + pars 552-R + parST1 PA4027 (1,006-R) + pPSVbicolorAP	Cette étude
VLB168 PAO1 Δ pars123 + pars2 552-R+ parST1 PA572 (628-R) + pPSVbicolorAP	Cette étude
VLB169 PAO1 Δ pars123 + pars2 552-R + parST1 PA3133 (2,000 -R) + pPSVbicolorAP	Cette étude

VLB170	PAO1 Δpars123 + pars2 552-R+ parST1 PA3573 (1,509-R) + pPSVbicolorAP	Cette étude
VLB171	PAO1 Δpars123 + pars2 552-R + parST1 PA2910 (2,250-R) + pPSVbicolorAP	Cette étude
VLB172	PAO1 Δpars123 + pars2 552-R+ parST1 PA2523 (2,499-R) + pPSVbicolorAP	Cette étude
VLB173	PAO1 Δpars123 + pars2 552-R + parst1 PA2258 (3,028-R) + pPSVbicolorAP	Cette étude
VLB174	PAO1 Δpars123 + pars2 552-R + parst1 PA290 (327-R) + pPSVbicolorAP	Cette étude
VLB186	PAO1 Δpars123 + pars2 552-R + parST1 PA0069 (82-R) + pPSVbicolorAP	Cette étude
VLB187	PAO1 Δpars123 + pars2 552-R + parST1 PA5480 (92-L) + pPSVbicolorAP	Cette étude
VLB188	PAO1 Δpars123 + pars2 552-R+ parST1 PA2319 (2,957-R) + pPSVbicolorAP	Cette étude
VLB199	PAO1 Δpars123 + pars2 552-R + parST1 PA4822 (851-L) + pPSVbicolorAP	Cette étude
VLB200	PAO1 Δpars123 + pars2 552-R + parST1 PA4457 (1,275-L) + pPSVbicolorAP	Cette étude
VLB201	PAO1 Δpars123 + pars2 552-R+ parST1 PA0981 (1,812-L) + pPSVbicolorAP	Cette étude
VLB225	PAO1 Δpars123 + pars2 552-R+ parST1 PA2666 (2,499-R) + pPSVbicolorAP	Cette étude
VLB226	PAO1 Δpars123 + pars2 552-R+ parST1 PA5126 (92-L) + pPSVbicolorAP	Cette étude
VLB227	PAO1 Δpars123 + pars2 552-R + parST1 PA1874 (2,784-L) + pPSVbicolorAP	Cette étude
VLB228	PAO1 Δpars123 + pars2 552-R + parST1 PA2127 (3,090-L) + pPSVbicolorAP	Cette étude
VLB229	PAO1 Δpars123 + pars2 552-R + parST1 PA1428 (2,302-L) + pPSVbicolorAP	Cette étude
VLB230	PAO1 Δpars123 + pars2 552-R + parST1 PA1643 (2,538-L) + pPSVbicolorAP	Cette étude
VLB243	PAO1 Δpars123 + pars2 552-R parST1 5480 (92-L) tetO 572 (628-R) + pPSVbicolorAP	Cette étude
VLB329	PAO1 Δpars123 + pars2 552-R parst1 3573 (1,509-R) teto 4457 (1,275-L) + pPSVbicolorAP	Cette étude
VLB330	PAO1 Δpars123 + pars2 552-R parst1 3573 (1,509-R) teto 5126 (92-L) + pPSVbicolorAP	Cette étude
VLB331	PAO1 Δpars123 + pars2 552-R parst1 4822 (851-L) teto 4027 (1,006-R) + pPSVbicolorAP	Cette étude
VLB332	PAO1 Δpars123 + pars2 552-R parst1 0981 (1,812-L) teto 3133 (2,000-R) + pPSVbicolorAP	Cette étude
IVGB575.1	PAO1 Δpars123 + pars2 552-R Δsmc	Cette étude
VLB372	PAO1 Δpars123+ pars2 552-R + pars 330-L PA ParST1 PA0069 (82-R) + pPSVbicolorAP	Cette étude
VLB373	PAO1 ΔPARS1234+ PARS2 552-R + PARS 330-L ParST1 PA0290 (327-R) + pPSVbicolorAP	Cette étude
VLB374	PAO1 ΔPARS1234+ PARS2 552-R + PARS 330-L ParST1 PA0572 (628-R) + pPSVbicolorAP	Cette étude
VLB375	PAO1 ΔPARS1234+ PARS2 552-R + PARS 330-L ParST1 PA3573 (1,509-R)+ pPSVbicolorAP	Cette étude
VLB376	PAO1 ΔPARS1234+ PARS2 552-R + PARS 330-L ParST1PA4027 (1,006-R)+ pPSVbicolorAP	Cette étude
VLB391	PAO1 ΔPARS1234+ PARS2 552-R + PARS 330-L TetO PA4822 (851-L) + pPSVbicolorAP	Cette étude
VLB392	PAO1 ΔPARS1234+ PARS2 552-R + PARS 330-L TetO PA4457 (1,275-L) + pPSVbicolorAP	Cette étude
VLB398	PAO1 ΔPARS1234+ PARS2 552-R + PARS 330-L ParST1 PA0069 (82-R) pPSVbicolorAP	Cette étude
VLB405	PAO1 ΔPARS1234+ PARS2 552-R + PARS 330-L ParsT1 PA0069 (82-R) tetO 5126 (488-L) pPSVbicolorAP	Cette étude
VLB406	PAO1 ΔPARS1234+ PARS2 552-R + PARS 330-L ParsT1 PA4027 (1,006-R) tetO 4457(1,275-L) pPSVbicolorAP	Cette étude
IVGB573	PAO1 ΔPARS1234+ PARS2 552-R + PARS 330-L Δsmc	Cette étude
VLB411	PAO1 ΔPARS1234+ PARS2 552-R + PARS 330-L TetO PA5480 (82-R) + pPSVbicolorAP	Cette étude
VLB412	PAO1 ΔPARS1234+ PARS2 552-R + PARS 330-L TetO PA5126 (92-L)+ pPSVbicolorAP	Cette étude
VLB419	PAO1 ΔPARS1234+ PARS2 552-R + PARS 330-L tetO PA1874 (2,784-L) + pPSVbicolorAP	Cette étude
VLB426	PAO1 ΔPARS1234+ PARS2 552-R + PARS 330-L ParsT1 PA2319 (2,957-R) + pPSVbicolorAP	Cette étude
VLB427	PAO1 ΔPARS1234+ PARS2 552-R + PARS 330-L tetO PA2127 (3,090-L) + pPSVbicolorAP	Cette étude
VLB435	PAO1 ΔPARS1234+ PARS2 552-R + PARS 330-L ParsT1 PA0981 (1,812-L) + pPSVbicolorAP	Cette étude

VLB436 PAO1 ΔPARS1234+ PARS2 552-R + PARS 330-L ParsT1 PA2666 (2,499-R) + pPSVbicolorAP	Cette étude
VLB437 PAO1 ΔPARS1234+ PARS2 552-R + PARS 330-L ParsT1 PA2910 (2,250-R) + pPSVbicolorAP	Cette étude
VLB441 PAO1 ΔPARS1234+ PARS2 552-R + PARS 330-L ParsT1 PA1643 (2,538-L) + pPSVbicolorAP	Cette étude
VLB442 PAO1 ΔPARS1234+ PARS2 552-R + PARS 330-L ParsT1 PA5126 (488-L) + pPSVbicolorAP	Cette étude
VLB446 PAO1 ΔPARS1234+ PARS2 552-R + PARS 330-L ParsT1 PA1428 (2,302-L) + pPSVbicolorAP	Cette étude
VLB377 PAO1 ΔPARS1234+ PARS 330-L Δrrnd ParsT1 PA0069 (82-R) + pPSVbicolorAP	Cette étude
VLB378 PAO1 ΔPARS1234 + PARS 330-L Δrrnd ParsT1 PA0290 (327-R) + pPSVbicolorAP	Cette étude
VLB379 PAO1 ΔPARS1234 + PARS 330-L Δrrnd ParsT1 PA0572 (628-R) + pPSVbicolorAP	Cette étude
VLB380 PAO1 ΔPARS1234 + PARS 330-L Δrrnd ParsT1 PA3573 (1,509-R) + pPSVbicolorAP	Cette étude
VLB393 PAO1 ΔPARS1234 + PARS 330-L Δrrnd TetO PA5480 (92-L) + pPSVbicolorAP	Cette étude
VLB394 PAO1 ΔPARS1234 + PARS 330-L Δrrnd TetO PA5126 (488-L) + pPSVbicolorAP	Cette étude
VLB395 PAO1 ΔPARS1234 + PARS 330-L Δrrnd TetO PA4822 (851-L)+ pPSVbicolorAP	Cette étude
VLB396 PAO1 ΔPARS1234 + PARS 330-L Δrrnd TetO PA4457 (1,275-L) + pPSVbicolorAP	Cette étude
VLB397 PAO1 ΔPARS1234 + PARS 330-L Δrrnd TetO PA0981 (1,812-L) + pPSVbicolorAP	Cette étude
VLB381 PAO1 ΔPARS1234 + PARS 330-L Δrrnd ParsT1 PA4027 (1,006-R) + pPSVbicolorAP	Cette étude
VLB401 PAO1 ΔPARS1234 + PARS 330-L Δrrnd ParsT1 PA0069 (82-R) post pFLP2 + pPSVbicolorAP	Cette étude
VLB402 PAO1 ΔPARS1234 + PARS 330-L Δrrnd ParsT1 PA0572 (628-R) post pFLP2 + pPSVbicolorAP	Cette étude
VLB403 PAO1 ΔPARS1234 + PARS 330-L Δrrnd ParsT1 PA4027 (1,006-R) post pFLP2 + pPSVbicolorAP	Cette étude
VLB404 PAO1 ΔPARS1234 + PARS 330-L Δrrnd ParsT1 PA3573 (1,509-R) post pFLP2 + pPSVbicolorAP	Cette étude
VLB407 PAO1 ΔPARS1234 + PARS 330-L Δrrnd ParsT1 PA0069 (82-R) tetO PA5126 (488-L) + pPSVbicolorAP	Cette étude
VLB408 PAO1 ΔPARS1234 + PARS 330-L Δrrnd ParsT1 PA4027 (1,006-R) tetO PA4457 (1,275-L) + pPSVbicolorAP	Cette étude
VLB409 PAO1 ΔPARS1234 + PARS 330-L Δrrnd ParsT1 PA3573 (1,509-R) tetO PA0981 (1,812-L) + pPSVbicolorAP	Cette étude
IVGB571 PAO1 ΔPARS1234 + PARS 330-L Δrrnd Δsmc	Cette étude
VLB418 PAO1 ΔPARS1234 + PARS 330-L Δrrnd tetO PA1874 (2,784-L) + pPSVbicolorAP	Cette étude
VLB424 PAO1 ΔPARS1234 + PARS 330-L Δrrnd tetO PA2258 (3,028-R) + pPSVbicolorAP	Cette étude
VLB425 PAO1 ΔPARS1234 + PARS 330-L Δrrnd tetO PA2127 (3,090-L) + pPSVbicolorAP	Cette étude
VLB432 PAO1 ΔPARS1234 + PARS 330-L Δrrnd ParsT1 PA2666 (2,499-R) + pPSVbicolorAP	Cette étude
VLB433 PAO1 ΔPARS1234 + PARS 330-L Δrrnd ParsT1 PA3133 (2,000-R) + pPSVbicolorAP	Cette étude
VLB434 PAO1 ΔPARS1234 + PARS 330-L Δrrnd ParsT1 PA1428 (2,302-L) + pPSVbicolorAP	Cette étude
VLB445 PAO1 ΔPARS1234 + PARS 330-L Δrrnd ParsT1 PA2910 (2,250-R) + pPSVbicolorAP	Cette étude
VLB450 PAO1 ΔPARS1234 + PARS 330-L Δrrnd ParsT1 PA 2523 (2,672-R)+ pPSVbicolorAP	Cette étude
VLB451 PAO1 ΔPARS1234 + PARS 330-L Δrrnd ParsT1 PA1643 (2,538-L) + pPSVbicolorAP	Cette étude
VLB455 PAO1 ΔPARS1234 + PARS 330-L + parS3 PA4778	Cette étude
VLB452 DparS123 + parS3 inséré à parS10	Cette étude
VLB454 DparS123 + parS3 PA306	Cette étude
VLB455 PAO1 ΔPARS1234 + PARS 330-L + parS3 PA4778	Cette étude
VLB460 PAO1 ΔparS123 pars2 PA3781	Cette étude
VLB462 Δpars123 Δrrn4 + pars2 PA4778	Cette étude

VLB463 PAO1 Δ PARS1234 + PARS 330-L + parsT1 PA0069 (82-R) post frt	Cette étude
VLB464 Δ pars123 + <i>parS2</i> PA4027 (1,006-R)	Cette étude
VLB466 Δ parS123 + parS3 PA306 post FRT	Cette étude
VLB467 PAO1 Δ PARS1234 + <i>parS</i> 330-L + parS3 PA4778 post FRT	Cette étude
VLB244 IVGB191 + PA5126 (92-L) tetO + pPSVbicolorAP	Cette étude
IVGB569.1 PAO1 Δ parS1234 + parS3 330-L Δ rrnd Δ smc	Cette étude

Liste de plasmides

pEXG2DparS1	plasmide pour la délétion du <i>parS1</i>	Gentamycine	disponible au laboratoire
pEXG2DparS2	plasmide pour la mutation du <i>parS2</i>	Gentamycine	disponible au laboratoire
pEXG2DparS3	plasmide pour la mutation du <i>parS3</i>	Gentamycine	disponible au laboratoire
pEXG2DparS4	plasmide pour la délétion du <i>parS4</i>	Gentamycine	disponible au laboratoire
pEXG2ΔΣMX	plasmide pour la délétion de SMC	Gentamycine	disponible au laboratoire
pEXG2DParA	plasmide pour la délétion de ParA	Gentamycine	disponible au laboratoire
pEXG2DParB	plasmide pour la délétion de ParB	Gentamycine	disponible au laboratoire
pFLP2	Plasmide qui porte la recombinase FLP et le gène SacB	Carbenicilline	disponible au laboratoire
pP30DFRT <i>parS9</i>	Insertion d'un <i>parS9</i>	Gentamycine	cette étude
pP30DFRT <i>parS2</i>	Insertion d'un <i>parS2</i>	Gentamycine	cette étude
pEXG2D<i>parS10</i>	Délétion de <i>parS10</i>	Gentamycine	cette étude
pEXG2D<i>parS6</i>	Délétion de <i>parS6</i>	Gentamycine	cette étude
pEXG2D<i>parS5</i>	Délétion de <i>parS5</i>	Gentamycine	cette étude
pEXG2D<i>parS6</i> + <i>parS3</i>	Insertion de <i>parS3</i> à la place de <i>parS6</i>	Gentamycine	cette étude
pEXG2D<i>parS5</i> + <i>parS3</i>	Insertion de <i>parS3</i> à la place de <i>parS5</i>	Gentamycine	cette étude
pEXG2D<i>parS10</i> + <i>parS3</i>	Insertion de <i>parS3</i> à la place de <i>parS10</i>	Gentamycine	cette étude
pP30DFRT <i>parS9</i>+ PA0004	Insertion d'un <i>parS9</i> à PA0004 (soit 6,5kb à droite de l'origine)	Gentamycine	cette étude
pP30DFRT <i>parS2</i>+ PA0004	Insertion d'un <i>parS2</i> à PA0004 (soit 6,5kb à droite de l'origine)	Gentamycine	cette étude
pP30DFRT <i>parS2</i>+ PA4778	Insertion d'un <i>parS2</i> à PA4778 (soit 898kb à gauche de l'origine)	Gentamycine	cette étude
pP30DFRT <i>parS2</i>+ PA5170	Insertion d'un <i>parS2</i> à PA5170 (soit 500kb à gauche de l'origine)	Gentamycine	cette étude
pP30DFRT <i>parS2</i>+ PA500	Insertion d'un <i>parS2</i> à PA500 (soit 560 kb à droite de l'origine)	Gentamycine	cette étude
pP30D-ParB-3xFLAG	Insertion d'une étiquette 3xFLAG sur ParB	Gentamycine	disponible au laboratoire
pP30D-SMC-3xFLAG	Insertion d'une étiquette 3xFLAG sur SMC	Gentamycine	disponible au laboratoire
ppSV35 bicolor	Plasmide qui porte les gènes codants les protéines ParBT1-yfp et TetR-cfp	Carbenicilline	Vallet-gély <i>et al</i> , 2013
pP30DtetO-PA5480	Insertion d'un tag TetO à PA5480	Gentamycine	Vallet-gély <i>et al</i> , 2013
pP30DtetO-PA5126	Insertion d'un tag TetO à PA5126	Gentamycine	Vallet-gély <i>et al</i> , 2013
pP30DtetO- PA0290	Insertion d'un tag TetO à PA0290	Gentamycine	Vallet-gély <i>et al</i> , 2013
pP30DtetO-PA0069	Insertion d'un tag TetO à PA0069	Gentamycine	Vallet-gély <i>et al</i> , 2013
pP30DtetO-PA0572	Insertion d'un tag TetO à PA0572	Gentamycine	Vallet-gély <i>et al</i> , 2013
pP30DtetO-PA4027	Insertion d'un tag TetO à PA4027	Gentamycine	Vallet-gély <i>et al</i> , 2013
pP30DtetO-PA3573	Insertion d'un tag TetO à PA3573	Gentamycine	Vallet-gély <i>et al</i> , 2013
pP30DtetO-PA0981	Insertion d'un tag TetO à PA0981	Gentamycine	Vallet-gély <i>et al</i> , 2013
pP30DtetO-PA4457	Insertion d'un tag TetO à PA4457	Gentamycine	Vallet-gély <i>et al</i> , 2013

pP30DtetO-PA4822	Insertion d'un tag TetO à PA4822	Gentamycine	Vallet-gély <i>et al</i> , 2013
pP30DtetO-PA2910	Insertion d'un tag TetO à PA2910	Gentamycine	Vallet-gély <i>et al</i> , 2013
pP30DtetO-PA2258	Insertion d'un tag TetO à PA2258	Gentamycine	Vallet-gély <i>et al</i> , 2013
pP30DtetO-PA2319	Insertion d'un tag TetO à PA2319	Gentamycine	Vallet-gély <i>et al</i> , 2013
pP30DtetO-PA2127	Insertion d'un tag TetO à PA2127	Gentamycine	Vallet-gély <i>et al</i> , 2013
pP30DtetO-PA1874	Insertion d'un tag TetO à PA1874	Gentamycine	Vallet-gély <i>et al</i> , 2013
pP30DtetO-PA1643	Insertion d'un tag TetO à PA1643	Gentamycine	Vallet-gély <i>et al</i> , 2013
pP30DtetO-PA1428	Insertion d'un tag TetO à PA1428	Gentamycine	Vallet-gély <i>et al</i> , 2013
pP30DtetO-PA3133	Insertion d'un tag TetO à PA3133	Gentamycine	Vallet-gély <i>et al</i> , 2013
pP30DtetO-PA2666	Insertion d'un tag TetO à PA2666	Gentamycine	Vallet-gély <i>et al</i> , 2013
pP30DtetO-PA2523	Insertion d'un tag TetO à PA2523	Gentamycine	Vallet-gély <i>et al</i> , 2013
pP30DFRTparST1-PA2127	Insertion d'un tag parST1 à PA2127	Gentamycine	Vallet-gély <i>et al</i> , 2013
pP30DFRTparST1-PA2319	Insertion d'un tag parST1 à PA2319	Gentamycine	Vallet-gély <i>et al</i> , 2013
pP30DFRTparST1-PA2258	Insertion d'un tag parST1 à PA2258	Gentamycine	Vallet-gély <i>et al</i> , 2013
pP30DFRTparST1-PA2666	Insertion d'un tag parST1 à PA2666	Gentamycine	Vallet-gély <i>et al</i> , 2013
pP30DFRTparST1-PA2523	Insertion d'un tag parST1 à PA2523	Gentamycine	Vallet-gély <i>et al</i> , 2013
pP30DFRTparST1-PA1874	Insertion d'un tag parST1 à PA1874	Gentamycine	Vallet-gély <i>et al</i> , 2013
pP30DFRTparST1-PA1643	Insertion d'un tag parST1 à PA1643	Gentamycine	Vallet-gély <i>et al</i> , 2013
pP30DFRTparST1-PA1428	Insertion d'un tag parST1 à PA1428	Gentamycine	Vallet-gély <i>et al</i> , 2013
pP30DFRTparST1-PA0981	Insertion d'un tag parST1 à PA0981	Gentamycine	Vallet-gély <i>et al</i> , 2013
pP30DFRTparST1-PA5480	Insertion d'un tag parST1 à PA5480	Gentamycine	Vallet-gély <i>et al</i> , 2013
pP30DFRTparST1-PA5126	Insertion d'un tag parST1 à PA5126	Gentamycine	Vallet-gély <i>et al</i> , 2013
pP30DFRTparST1-PA4822	Insertion d'un tag parST1 à PA4822	Gentamycine	Vallet-gély <i>et al</i> , 2013
pP30DFRTparST1-PA4457	Insertion d'un tag parST1 à PA4457	Gentamycine	Vallet-gély <i>et al</i> , 2013
pP30DFRTparST1-PA0572	Insertion d'un tag parST1 à PA0572	Gentamycine	Vallet-gély <i>et al</i> , 2013
pP30DFRTparST1-PA0290	Insertion d'un tag parST1 à PA0290	Gentamycine	Vallet-gély <i>et al</i> , 2013
pP30DFRTparST1-PA4027	Insertion d'un tag parST1 à PA4027	Gentamycine	Vallet-gély <i>et al</i> , 2013
pP30DFRTparST1-PA3133	Insertion d'un tag parST1 à PA3133	Gentamycine	Vallet-gély <i>et al</i> , 2013
pP30DFRTparST1-PA2910	Insertion d'un tag parST1 à PA2910	Gentamycine	Vallet-gély <i>et al</i> , 2013
pP30DFRTparST1-PA3573	Insertion d'un tag parST1 à PA3573	Gentamycine	Vallet-gély <i>et al</i> , 2013
pP30DFRTparST1-PA0069	Insertion d'un tag parST1 à PA0069	Gentamycine	Vallet-gély <i>et al</i> , 2013
pEXMDrrnD	Délétion du rrnD	Gentamycine	Vallet-gély <i>et al</i> , 2013

BIBLIOGRAPHIE

- Adams, D.E., Shekhtman, E.M., Zechiedrich, E.L., Schmid, M.B., and 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.
- Adams, D.W., Wu, L.J., and Errington, J. (2015). Nucleoid occlusion protein Noc recruits DNA to the bacterial cell membrane. *EMBO J.* **34**, 491–501.
- Ali Azam, T., Iwata, A., Nishimura, A., Ueda, S., and Ishihama, A. (1999). Growth phase-dependent variation in protein composition of the Escherichia coli nucleoid. *J. Bacteriol.* **181**, 6361–6370.
- Austin, S.J., Mural, R.J., Chatteraj, D.K., and Abeles, A.L. (1985). Trans- and cis-acting elements for the replication of P1 miniplasmids. *J. Mol. Biol.* **183**, 195–202.
- Badrinarayanan, A., Le, T.B.K., and Laub, M.T. (2015). Bacterial Chromosome Organization and Segregation. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **31**, 171–199.
- Baek, J.H., Rajagopala, S. V., and Chatteraj, D.K. (2014). Chromosome Segregation Proteins of *Vibrio cholerae* as Transcription Regulators. *MBio* **5**, e01061-14-e01061-14.
- Bartosik, A.A., Lasocki, K., Mierzejewska, J., Thomas, C.M., and Jagura-Burdzy, G. (2004). ParB of *Pseudomonas aeruginosa*: Interactions with Its Partner ParA and Its Target parS and Specific Effects on Bacterial Growth. *J. Bacteriol.* **186**, 6983–6998.
- Bartosik, A.A., Glabski, K., Jecz, P., Mikulska, S., Fogtman, A., Koblowaska, M., and Jagura-Burdzy, G. (2014). Transcriptional profiling of para and ParB mutants in actively dividing cells of an opportunistic human pathogen *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS One* **9**.
- Bates, D., and Kleckner, N. (2005). Chromosome and Replisome Dynamics in *E. coli*: Loss of Sister Cohesion Triggers Global Chromosome Movement and Mediates Chromosome Segregation. *Cell* **121**, 899–911.
- Bernhardt, T.G., and de Boer, P.A.J. (2005). SlmA, a nucleoid-associated, FtsZ binding protein required for blocking septal ring assembly over Chromosomes in *E. coli*. *Mol. Cell* **18**, 555–564.
- Bigot, S., Sivanathan, V., Possoz, C., Barre, F.-X., and Cornet, F. (2007). FtsK, a literate chromosome segregation machine. *Mol. Microbiol.* **64**, 1434–1441.
- Blattner, F.R., Plunkett, G., Bloch, C.A., Perna, N.T., Burland, V., Riley, M., Collado-Vides, J., Glasner, J.D., Rode, C.K., Mayhew, G.F., et al. (1997). The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science* **277**, 1453–1462.
- Breier, A.M., and Grossman, A.D. (2007). Whole-genome analysis of the chromosome partitioning and sporulation protein Spo0J (ParB) reveals spreading and origin-distal sites on

the *Bacillus subtilis* chromosome. *Mol. Microbiol.* *64*, 703–718.

Brezellec, P., Hoebeke, M., Hiet, M.-S., Pasek, S., and 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., and Grossman, A.D. (1998). Characterization of a prokaryotic SMC protein involved in chromosome partitioning. *Genes Dev.* *12*, 1254–1259.

Broedersz, C.P., Wang, X., Meir, Y., Loparo, J.J., Rudner, D.Z., and Wingreen, N.S. (2014). Condensation and localization of the partitioning protein ParB on the bacterial chromosome. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *111*, 8809–8814.

Brooks, A.C., and Hwang, L.C. (2017). Reconstitutions of plasmid partition systems and their mechanisms. *Plasmid* *91*, 37–41.

Bürmann, F., Shin, H.-C., Basquin, J., Soh, Y.-M., Giménez-Oya, V., Kim, Y.-G., Oh, B.-H., and Gruber, S. (2013). An asymmetric SMC-kleisin bridge in prokaryotic condensin. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *20*, 371–379.

Bürmann, F., Basfeld, A., Vazquez Nunez, R., Diebold-Durand, M.-L., Wilhelm, L., and Gruber, S. (2017). Tuned SMC Arms Drive Chromosomal Loading of Prokaryotic Condensin. *Mol. Cell* *65*, 861–872.e9.

Cairns, J. (1963). The bacterial chromosome and its manner of replication as seen by autoradiography. *J. Mol. Biol.* *6*, 208–213.

Campbell, C.S., and Mullins, R.D. (2007). In vivo visualization of type II plasmid segregation: bacterial actin filaments pushing plasmids. *J. Cell Biol.* *179*, 1059–1066.

Carnoy, C., and Roten, C.-A. (2009). The dif/Xer Recombination Systems in Proteobacteria. *PLoS One* *4*, e6531.

Casjens, S. (1998). THE DIVERSE AND DYNAMIC STRUCTURE OF BACTERIAL GENOMES. *Annu. Rev. Genet.* *32*, 339–377.

Chandler, M.G., and Pritchard, R.H. (1975). The effect of gene concentration and relative gene dosage on gene output in *Escherichia coli*. *Mol. Gen. Genet.* *138*, 127–141.

Chen, B.-W., Lin, M.-H., Chu, C.-H., Hsu, C.-E., and Sun, Y.-J. (2015). Insights into ParB spreading from the complex structure of Spo0J and parS. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *112*, 6613–6618.

Chiang, S.L., and Rubin, E.J. (2002). Construction of a mariner-based transposon for epitope-tagging and genomic targeting. *Gene* *296*, 179–185.

Cho, H., McManus, H.R., Dove, S.L., and Bernhardt, T.G. (2011). Nucleoid occlusion factor SlmA is a DNA-activated FtsZ polymerization antagonist. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *108*, 3773–3778.

- Cournac, A., Marie-Nelly, H., Marbouty, M., Koszul, R., and Mozziconacci, J. (2012). Normalization of a chromosomal contact map. *BMC Genomics* *13*, 436.
- Cuylen, S., Metz, J., and Haering, C.H. (2011). Condensin structures chromosomal DNA through topological links. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *18*, 894–901.
- Dame, R.T. (2005). The role of nucleoid-associated proteins in the organization and compaction of bacterial chromatin. *Mol. Microbiol.* *56*, 858–870.
- Danilova, O., Reyes-Lamothe, R., Pinskaya, M., Sherratt, D., and 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.
- David, A., Demarre, G., Muresan, L., Paly, E., Barre, F.-X., and Possoz, C. (2014). The Two Cis-Acting Sites, parS1 and oriC1, Contribute to the Longitudinal Organisation of *Vibrio cholerae* Chromosome I. *PLoS Genet.* *10*, e1004448.
- de Wit, E., Vos, E.S.M., Holwerda, S.J.B., Valdes-Quezada, C., Verstegen, M.J.A.M., Teunissen, H., Splinter, E., Wijchers, P.J., Krijger, P.H.L., and de Laat, W. (2015). CTCF Binding Polarity Determines Chromatin Looping. *Mol. Cell* *60*, 676–684.
- Deshpande, A.M., and Newlon, C.S. (1996). DNA replication fork pause sites dependent on transcription. *Science* *272*, 1030–1033.
- Dillon, S.C., and Dorman, C.J. (2010). Bacterial nucleoid-associated proteins, nucleoid structure and gene expression. *Nat. Rev. Microbiol.* *8*, 185–195.
- Dixon, J.R., Selvaraj, S., Yue, F., Kim, A., Li, Y., Shen, Y., Hu, M., Liu, J.S., and Ren, B. (2012). Topological domains in mammalian genomes identified by analysis of chromatin interactions. *Nature* *485*, 376–380.
- Donovan, C., Sieger, B., Krämer, R., and Bramkamp, M. (2012). A synthetic *Escherichia coli* system identifies a conserved origin tethering factor in Actinobacteria. *Mol. Microbiol.* *84*, 105–116.
- Duigou, S., and Boccard, F. (2017). Long range chromosome organization in *Escherichia coli*: The position of the replication origin defines the non-structured regions and the Right and Left macrodomains. *PLOS Genet.* *13*, e1006758.
- Ebersbach, G., and Gerdes, K. (2005). Plasmid segregation mechanisms. *Annu. Rev. Genet.* *39*, 453–479.
- Feijoo-Siota, L., Rama, J.L.R., Sánchez-Pérez, A., and Villa, T.G. (2017). Considerations on bacterial nucleoids. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* *101*, 5591–5602.
- Fekete, R.A., and Chatteraj, D.K. (2004). A cis-acting sequence involved in chromosome segregation in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* *55*, 175–183.
- Fiebig, A., Keren, K., and Theriot, J.A. (2006). Fine-scale time-lapse analysis of the biphasic, dynamic behaviour of the two *Vibrio cholerae* chromosomes. *Mol. Microbiol.* *60*, 1164–

1178.

Fink, G., and Löwe, J. (2015). Reconstitution of a prokaryotic minus end-tracking system using TubRC centromeric complexes and tubulin-like protein TubZ filaments. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *112*, E1845-50.

Fogel, M.A., and Waldor, M.K. (2006). A dynamic, mitotic-like mechanism for bacterial chromosome segregation. *Genes Dev.* *20*, 3269–3282.

Fortin, J.-P., and Hansen, K.D. (2015). Reconstructing A/B compartments as revealed by Hi-C using long-range correlations in epigenetic data. *Genome Biol.* *16*, 180.

French, S. (1992). Consequences of replication fork movement through transcription units in vivo. *Science* *258*, 1362–1365.

Fudenberg, G., Imakaev, M., Lu, C., Goloborodko, A., Abdennur, N., and Mirny, L. (2016). Formation of Chromosomal Domains by Loop Extrusion. *Cell Rep.* *15*, 2038–2049.

Funnell, B.E. (2016). ParB Partition Proteins: Complex Formation and Spreading at Bacterial and Plasmid Centromeres. *Front. Mol. Biosci.* *3*, 44.

Gaal, T., Bratton, B.P., Sanchez-Vazquez, P., Sliwicki, A., Sliwicki, K., Vogel, A., Pannu, R., and Gourse, R.L. (2016). Colocalization of distant chromosomal loci in space in *E. coli* : a bacterial nucleolus. *Genes Dev.* *30*, 2272–2285.

Le Gall, A., Cattoni, D.I., Guilhas, B., Mathieu-Demazière, C., Oudjedi, L., Fiche, J.-B., Rech, J., Abrahamsson, S., Murray, H., Bouet, J.-Y., et al. (2016). Bacterial partition complexes segregate within the volume of the nucleoid. *Nat. Commun.* *7*, 12107.

Gollosi, R., Sanders, J.T., and McCord, R.P. (2017). Genome organization during the cell cycle: unity in division. *Wiley Interdiscip. Rev. Syst. Biol. Med.* e1389.

Goloborodko, A., Marko, J., and Mirny, L. (2016). Chromosome Compaction by Active Loop Extrusion. *Biophys. J.* *110*, 2162–2168.

Graham, T.G.W., Wang, X., Song, D., Eton, C.M., van Oijen, A.M., Rudner, D.Z., and Loparo, J.J. (2014). ParB spreading requires DNA bridging. *Genes Dev.* *28*, 1228–1238.

Gregory, J.A., Becker, E.C., and Pogliano, K. (2008). *Bacillus subtilis* MinC destabilizes FtsZ-rings at new cell poles and contributes to the timing of cell division. *Genes Dev.* *22*, 3475–3488.

Gruber, S. (2011). MukBEF on the march: taking over chromosome organization in bacteria? *Mol. Microbiol.* *81*, 855–859.

Gruber, S., and Errington, J. (2009). Recruitment of Condensin to Replication Origin Regions by ParB/SpoOJ Promotes Chromosome Segregation in *B. subtilis*. *Cell* *137*, 685–696.

Gruber, S., Arumugam, P., Katou, Y., Kuglitsch, D., Helmhart, W., Shirahige, K., and Nasmyth, K. (2006). Evidence that Loading of Cohesin Onto Chromosomes Involves Opening of Its SMC

Hinge. *Cell* 127, 523–537.

Gruber, S., Veening, J.-W., Bach, J., Blettinger, M., Bramkamp, M., and Errington, J. (2014). Interlinked Sister Chromosomes Arise in the Absence of Condensin during Fast Replication in *B. subtilis*. *Curr. Biol.* 24, 293–298.

Haering, C.H., Farcas, A.-M., Arumugam, P., Metson, J., and Nasmyth, K. (2008). The cohesin ring concatenates sister DNA molecules. *Nature* 454, 297–301.

Harms, A., Treuner-Lange, A., Schumacher, D., and Sjøgaard-Andersen, L. (2013). Tracking of Chromosome and Replisome Dynamics in *Myxococcus xanthus* Reveals a Novel Chromosome Arrangement. *PLoS Genet.* 9, 19–23.

Hayama, R., and 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.

Higgins, N.P., Yang, X., Fu, Q., and Roth, J.R. (1996). Surveying a supercoil domain by using the gamma delta resolution system in *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* 178, 2825–2835.

Hiraga, S. (2000). Dynamic Localization of Bacterial and Plasmid Chromosomes. *Annu. Rev. Genet.* 34, 21–59.

Hirano, T., and Mitchison, T.J. (1994). A heterodimeric coiled-coil protein required for mitotic chromosome condensation in vitro. *Cell* 79, 449–458.

Hong, S.-H., and McAdams, H.H. (2011). Compaction and transport properties of newly replicated *Caulobacter crescentus* DNA. *Mol. Microbiol.* 82, 1349–1358.

Huisman, O., Faelen, M., Girard, D., Jaffé, A., Toussaint, A., and Rouvière-Yaniv, J. (1989). Multiple defects in *Escherichia coli* mutants lacking HU protein. *J. Bacteriol.* 171, 3704–3712.

Hwang, L.C., Vecchiarelli, A.G., Han, Y.-W., Mizuuchi, M., Harada, Y., Funnell, B.E., and Mizuuchi, K. (2013). ParA-mediated plasmid partition driven by protein pattern self-organization. *EMBO J.* 32, 1238–1249.

Iniesta, A.A. (2014). ParABS system in chromosome partitioning in the bacterium *Myxococcus xanthus*. *PLoS One* 9.

Iretton, K., Gunther, N.W., and Grossman, A.D. (1994). *spo0J* is required for normal chromosome segregation as well as the initiation of sporulation in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 176, 5320–5329.

Jacob, F., Brenner, S., and Cuzin, F. (1963). On the Regulation of DNA Replication in Bacteria. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 28, 329–348.

Jensen, R.B., and Shapiro, L. (1999). The *Caulobacter crescentus* *smc* gene is required for cell cycle progression and chromosome segregation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 10661–10666.

- Jensen, R.B., Wang, S.C., and Shapiro, L. (2001). A moving DNA replication factory in *Caulobacter crescentus*. *EMBO J.* *20*, 4952–4963.
- Joshi, M.C., Bourniquel, A., Fisher, J., Ho, B.T., Magnan, D., Kleckner, N., and 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.* *108*, 2765–2770.
- Jun, S., and Mulder, B. (2006). Entropy-driven spatial organization of highly confined polymers: Lessons for the bacterial chromosome. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *103*, 12388–12393.
- Kanno, T., Berta, D.G., and Sjögren, C. (2015). The Smc5/6 Complex Is an ATP-Dependent Intermolecular DNA Linker. *Cell Rep.* *12*, 1471–1482.
- Kavenoff, R., and Bowen, B.C. (1976). Electron microscopy of membrane-free folded chromosomes from *Escherichia coli*. *Chromosoma* *59*, 89–101.
- Kavenoff, R., and Ryder, O.A. (1976). Electron microscopy of membrane-associated folded chromosomes of *Escherichia coli*. *Chromosoma* *55*, 13–25.
- Khodursky, A.B., Peter, B.J., Schmid, M.B., DeRisi, J., Botstein, D., Brown, P.O., and 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.
- Kim, J., Yoshimura, S.H., Hizume, K., Ohniwa, R.L., Ishihama, A., and Takeyasu, K. (2004). Fundamental structural units of the *Escherichia coli* nucleoid revealed by atomic force microscopy. *Nucleic Acids Res.* *32*, 1982–1992.
- Kleckner, N., Fisher, J.K., Stouf, M., White, M.A., Bates, D., and Witz, G. (2014). The bacterial nucleoid: nature, dynamics and sister segregation. *Curr. Opin. Microbiol.* *22*, 127–137.
- Kono, N., Arakawa, K., and Tomita, M. (2011). Comprehensive prediction of chromosome dimer resolution sites in bacterial genomes. *BMC Genomics* *12*, 19.
- Kunst, F., Ogasawara, N., Moszer, I., Albertini, A.M., Alloni, G., Azevedo, V., Bertero, M.G., Bessières, P., Bolotin, A., Borchert, S., et al. (1997). The complete genome sequence of the gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. *Nature* *390*, 249–256.
- Kusiak, M., Gapczynska, A., Plochocka, D., Thomas, C.M., and Jagura-Burdzy, G. (2011). Binding and Spreading of ParB on DNA Determine Its Biological Function in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* *193*, 3342–3355.
- Lam, H., Schofield, W.B., and Jacobs-Wagner, C. (2006). A landmark protein essential for establishing and perpetuating the polarity of a bacterial cell. *Cell* *124*, 1011–1023.
- Larsen, R.A., Cusumano, C., Fujioka, A., Lim-Fong, G., Patterson, P., and Pogliano, J. (2007). Treadmilling of a prokaryotic tubulin-like protein, TubZ, required for plasmid stability in *Bacillus thuringiensis*. *Genes Dev.* *21*, 1340–1352.
- Le, T.B., and Laub, M.T. (2016). Transcription rate and transcript length drive formation of chromosomal interaction domain boundaries. *EMBO J.* *35*, 1582–1595.

- Le, T.B.K., Imakaev, M. V., Mirny, L.A., and Laub, M.T. (2013). High-Resolution Mapping of the Spatial Organization of a Bacterial Chromosome. *Science* (80-.). *342*, 731–734.
- Lee, J.Y., Finkelstein, I.J., Crozat, E., Sherratt, D.J., and Greene, E.C. (2012). Single-molecule imaging of DNA curtains reveals mechanisms of KOPS sequence targeting by the DNA translocase FtsK. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *109*, 6531–6536.
- Lemon, K.P., and Grossman, A.D. (1998). Localization of bacterial DNA polymerase: evidence for a factory model of replication. *Science* *282*, 1516–1519.
- Leonard, T.A., Butler, P.J.G., and Löwe, J. (2004). Structural analysis of the chromosome segregation protein Spo0J from *Thermus thermophilus*. *Mol. Microbiol.* *53*, 419–432.
- Li, Y., Stewart, N.K., Berger, A.J., Vos, S., Schoeffler, A.J., Berger, J.M., Chait, B.T., and Oakley, M.G. (2010). *Escherichia coli* condensin MukB stimulates topoisomerase IV activity by a direct physical interaction. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *107*, 18832–18837.
- Lieberman-Aiden, E., van Berkum, N.L., Williams, L., Imakaev, M., Ragoczy, T., Telling, A., Amit, I., Lajoie, B.R., Sabo, P.J., Dorschner, M.O., et al. (2009). Comprehensive mapping of long-range interactions reveals folding principles of the human genome. *Science* *326*, 289–293.
- Lim, H.C., Surovtsev, I.V., Beltran, B.G., Huang, F., Bewersdorf, J., and Jacobs-Wagner, C. (2014). Evidence for a DNA-relay mechanism in ParABS-mediated chromosome segregation. *Elife* *3*, e02758.
- Lin, D.C., and Grossman, A.D. (1998). Identification and characterization of a bacterial chromosome partitioning site. *Cell* *92*, 675–685.
- Livny, J., Yamaichi, Y., and Waldor, M.K. (2007). Distribution of centromere-like parS sites in bacteria: Insights from comparative genomics. *J. Bacteriol.* *189*, 8693–8703.
- Luijsterburg, M.S., and Noom, M.C. (2006). The architectural role of nucleoid-associated proteins in the organization of bacterial chromatin: A molecular perspective. *J. Struct. Biol.* *156*, 262–272.
- Lutkenhaus, J. (2007). Assembly Dynamics of the Bacterial MinCDE System and Spatial Regulation of the Z Ring. *Annu. Rev. Biochem.* *76*, 539–562.
- Lynch, A.S., and Wang, J.C. (1995). SopB protein-mediated silencing of genes linked to the sopC locus of *Escherichia coli* F plasmid. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *92*, 1896–1900.
- Marbouty, M., Le Gall, A., Cattoni, D., Cournac, A., Koh, A., Fiche, J.-B., Mozziconacci, J., Murray, H., Koszul, R., and Nollmann, M. (2015). Condensin- and Replication-Mediated Bacterial Chromosome Folding and Origin Condensation Revealed by Hi-C and Super-resolution Imaging. *Mol. Cell* *59*, 588–602.
- McLean, M.J., Wolfe, K.H., and Devine, K.M. (1998). Base composition skews, replication orientation, and gene orientation in 12 prokaryote genomes. *J. Mol. Evol.* *47*, 691–696.

- Mercier, R., Petit, M.-A., Schbath, S., Robin, S., El Karoui, M., Boccard, F., and Espéli, O. (2008). The MatP/matS Site-Specific System Organizes the Terminus Region of the *E. coli* Chromosome into a Macrodomain. *Cell* *135*, 475–485.
- Midonet, C., and Barre, F.-X. (2014). Xer Site-Specific Recombination: Promoting Vertical and Horizontal Transmission of Genetic Information. *Microbiol. Spectr.* *2*.
- Mierzejewska, J., and Jagura-Burdzy, G. (2012). Prokaryotic ParA–ParB–parS system links bacterial chromosome segregation with the cell cycle. *Plasmid* *67*, 1–14.
- Minnen, A., Bürmann, F., Wilhelm, L., Anchimiuk, A., Diebold-Durand, M.-L., and Gruber, S. (2016). Control of Smc Coiled Coil Architecture by the ATPase Heads Facilitates Targeting to Chromosomal ParB/parS and Release onto Flanking DNA. *Cell Rep.* *14*, 2003–2016.
- Mohl, D.A., Easter, J., and Gober, J.W. (2001). The chromosome partitioning protein, ParB, is required for cytokinesis in *Caulobacter crescentus*. *Mol. Microbiol.* *42*, 741–755.
- Morales, V., Giamarchi, C., Chailleux, C., Moro, F., Marsaud, V., Le Ricousse, S., and Richard-Foy, H. (2001). Chromatin structure and dynamics: functional implications. *Biochimie* *83*, 1029–1039.
- Murayama, Y., and Uhlmann, F. (2014). Biochemical reconstitution of topological DNA binding by the cohesin ring. *Nature* *505*, 367–371.
- Murray, H., Ferreira, H., and Errington, J. (2006). The bacterial chromosome segregation protein Spo0J spreads along DNA from parS nucleation sites. *Mol. Microbiol.* *61*, 1352–1361.
- Nanninga, N. (1998). Morphogenesis of *Escherichia coli*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* *62*, 110–129.
- Nasmyth, K. (2001). Disseminating the genome: joining, resolving, and separating sister chromatids during mitosis and meiosis. *Annu. Rev. Genet.* *35*, 673–745.
- Nasmyth, K. (2002). Segregating Sister Genomes: The Molecular Biology of Chromosome Separation. *Science* (80-.). *297*, 559–565.
- Nasmyth, K., and Haering, C.H. (2005). THE STRUCTURE AND FUNCTION OF SMC AND KLEISIN COMPLEXES. *Annu. Rev. Biochem.* *74*, 595–648.
- Nielsen, H.J., Ottesen, J.R., Youngren, B., Austin, S.J., and Hansen, F.G. (2006). The *Escherichia coli* chromosome is organized with the left and right chromosome arms in separate cell halves. *Mol. Microbiol.* *62*, 331–338.
- Niki, H., Jaffé, A., Imamura, R., Ogura, T., and 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., and Hiraga, S. (2000). Dynamic organization of chromosomal DNA in *Escherichia coli*. *Genes Dev.* *14*, 212–223.

- Noom, M.C., Navarre, W.W., Oshima, T., Wuite, G.J.L., and Dame, R.T. (2007). H-NS promotes looped domain formation in the bacterial chromosome. *Curr. Biol.* *17*, R913-4.
- Ohniwa, R.L., Ushijima, Y., Saito, S., and Morikawa, K. (2011). Proteomic analyses of nucleoid-associated proteins in *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, and *Staphylococcus aureus*. *PLoS One* *6*, e19172.
- Palecek, J.J., and Gruber, S. (2015). Kite Proteins: a Superfamily of SMC/Kleisin Partners Conserved Across Bacteria, Archaea, and Eukaryotes. *Structure* *23*, 2183–2190.
- Peter, B.J., Ullsperger, C., Hiasa, H., Marians, K.J., and Cozzarelli, N.R. (1998). The structure of supercoiled intermediates in DNA replication. *Cell* *94*, 819–827.
- Petrushenko, Z.M., She, W., and Rybenkov, V. V. (2011). A new family of bacterial condensins. *Mol. Microbiol.* *81*, 881–896.
- Postow, L., Hardy, C.D., Arsuaga, J., and Cozzarelli, N.R. (2004). Topological domain structure of the *Escherichia coli* chromosome. *Genes Dev.* *18*, 1766–1779.
- Ptacin, J.L., Lee, S.F., Garner, E.C., Toro, E., Eckart, M., Comolli, L.R., Moerner, W.E., and Shapiro, L. (2010). A spindle-like apparatus guides bacterial chromosome segregation. *Nat. Cell Biol.* *12*, 791–798.
- Ramachandran, R., Jha, J., and Chatteraj, D.K. (2014). Chromosome Segregation in *Vibrio cholerae*. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* *24*, 360–370.
- Reyes-Lamothe, R., Possoz, C., Danilova, O., and Sherratt, D.J. (2008). Independent Positioning and Action of *Escherichia coli* Replisomes in Live Cells. *Cell* *133*, 90–102.
- Rietsch, A., Vallet-Gely, I., Dove, S.L., and Mekalanos, J.J. (2005). ExsE, a secreted regulator of type III secretion genes in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *102*, 8006–8011.
- Robinow, C., and Kellenberger, E. (1994). The bacterial nucleoid revisited. *Microbiol. Rev.* *58*, 211–232.
- Rocha, E.P.C. (2004). The replication-related organization of bacterial genomes. *Microbiology* *150*, 1609–1627.
- Rocha, E.P.C. (2008). The Organization of the Bacterial Genome. *Annu. Rev. Genet.* *42*, 211–233.
- Rodionov, O., Lobočka, M., and Yarmolinsky, M. (1999). Silencing of genes flanking the P1 plasmid centromere. *Science* *283*, 546–549.
- Rowlett, V.W., and Margolin, W. (2015). The Min system and other nucleoid-independent regulators of Z ring positioning. *Front. Microbiol.* *6*.
- Rybenkov, V. V, Herrera, V., Petrushenko, Z.M., and Zhao, H. (2014). MukBEF, a chromosomal organizer. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* *24*, 371–383.

- Sanchez, A., Cattoni, D.I., Walter, J.-C., Rech, J., Parmeggiani, A., Nollmann, M., and Bouet, J.-Y. (2015). Stochastic Self-Assembly of ParB Proteins Builds the Bacterial DNA Segregation Apparatus. *Cell Syst.* *1*, 163–173.
- El Sayyed, H., Le Chat, L., Lebailly, E., Vickridge, E., Pages, C., Cornet, F., Cosentino Lagomarsino, M., and Esp?li, O. (2016). Mapping Topoisomerase IV Binding and Activity Sites on the *E. coli* Genome. *PLOS Genet.* *12*, e1006025.
- Schofield, W.B., Lim, H.C., and Jacobs-Wagner, C. (2010). Cell cycle coordination and regulation of bacterial chromosome segregation dynamics by polarly localized proteins. *EMBO J.* *29*, 3068–3081.
- Schwartz, M.A., and Shapiro, L. (2011). An SMC ATPase mutant disrupts chromosome segregation in *Caulobacter*. *Mol. Microbiol.* *82*, 1359–1374.
- Silby, M.W., Winstanley, C., Godfrey, S.A.C., Levy, S.B., and Jackson, R.W. (2011). *Pseudomonas* genomes: diverse and adaptable. *FEMS Microbiol. Rev.* *35*, 652–680.
- Sinden, R.R., and 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.
- Soh, Y.-M., Bürmann, F., Shin, H.-C., Oda, T., Jin, K.S., Toseland, C.P., Kim, C., Lee, H., Kim, S.J., Kong, M.-S., et al. (2015). Molecular basis for SMC rod formation and its dissolution upon DNA binding. *Mol. Cell* *57*, 290–303.
- Song, D., Rodrigues, K., Graham, T.G.W., and Loparo, J.J. (2017). A network of cis and trans interactions is required for ParB spreading. *Nucleic Acids Res.* *45*, 7106–7117.
- Soppa, J., Kobayashi, K., Noirot-Gros, M.F., Oesterhelt, D., Ehrlich, S.D., Dervyn, E., Ogasawara, N., and Moriya, S. (2002). Discovery of two novel families of proteins that are proposed to interact with prokaryotic SMC proteins, and characterization of the *Bacillus subtilis* family members ScpA and ScpB. *Mol. Microbiol.* *45*, 59–71.
- Steiner, W.W., and Kuempel, P.L. (1998). Sister chromatid exchange frequencies in *Escherichia coli* analyzed by recombination at the *dif* resolvase site. *J. Bacteriol.* *180*, 6269–6275.
- Stover, C.K., Pham, X.Q., Erwin, A.L., Mizoguchi, S.D., Warrener, P., Hickey, M.J., Brinkman, F.S.L., Hufnagle, W.O., Kowalik, D.J., Lagrou, M., et al. (2000). Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature* *406*, 959–964.
- Strunnikov, A. V, Larionov, V.L., and 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.
- Strunnikov, A. V, Hogan, E., and Koshland, D. (1995). SMC2, a *Saccharomyces cerevisiae* gene essential for chromosome segregation and condensation, defines a subgroup within the SMC family. *Genes Dev.* *9*, 587–599.
- Sullivan, N.L., Marquis, K.A., and Rudner, D.Z. (2009). Recruitment of SMC by ParB-parS

Organizes the Origin Region and Promotes Efficient Chromosome Segregation. *Cell* *137*, 697–707.

Swiercz, J.P., Nanji, T., Gloyd, M., Guarné, A., and Elliot, M.A. (2013). A novel nucleoid-associated protein specific to the actinobacteria. *Nucleic Acids Res.* *41*, 4171–4184.

Swinger, K.K., and Rice, P.A. (2004). IHF and HU: flexible architects of bent DNA. *Curr. Opin. Struct. Biol.* *14*, 28–35.

Takeyasu, K., Kim, J., Ohniwa, R.L., Kobori, T., Inose, Y., Morikawa, K., Ohta, T., Ishihama, A., and Yoshimura, S.H. (2004). Genome architecture studied by nanoscale imaging: analyses among bacterial phyla and their implication to eukaryotic genome folding. *Cytogenet. Genome Res.* *107*, 38–48.

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

Toro, E., Hong, S.H., McAdams, H.H., and Shapiro, L. (2008). *Caulobacter* requires a dedicated mechanism to initiate chromosome segregation. *Proc Natl Acad Sci U S A* *105*, 15435–15440.

Tran, N.T., Laub, M.T., and Le, T.B.K. (2017). SMC Progressively Aligns Chromosomal Arms in *Caulobacter crescentus* but Is Antagonized by Convergent Transcription. *Cell Rep.* *20*, 2057–2071.

Treuner-Lange, A., Aguiluz, K., van der Does, C., Gómez-Santos, N., Harms, A., Schumacher, D., Lenz, P., Hoppert, M., Kahnt, J., Muñoz-Dorado, J., et al. (2013). PomZ, a ParA-like protein, regulates Z-ring formation and cell division in *Myxococcus xanthus*. *Mol. Microbiol.* *87*, 235–253.

Uhlmann, F. (2016). SMC complexes: from DNA to chromosomes. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *17*, 399–412.

Umbarger, M.A., Toro, E., Wright, M.A., Porreca, G.J., Baù, D., Hong, S.H., Fero, M.J., Zhu, L.J., Marti-Renom, M.A., McAdams, H.H., et al. (2011). The three-dimensional architecture of a bacterial genome and its alteration by genetic perturbation. *Mol. Cell* *44*, 252–264.

Val, M.-E., Soler-Bistué, A., Bland, M.J., and Mazel, D. (2014). Management of multipartite genomes: the *Vibrio cholerae* model. *Curr. Opin. Microbiol.* *22*, 120–126.

Valens, M., Penaud, S., Rossignol, M., Cornet, F., and Boccard, F. (2004). Macrodomain organization of the *Escherichia coli* chromosome. *EMBO J.* *23*, 4330–4341.

Valens, M., Thiel, A., and Boccard, F. (2016). The MaoP/maoS Site-Specific System Organizes the Ori Region of the *E. coli* Chromosome into a Macrodomain. *PLOS Genet.* *12*, e1006309.

Vallet-Gely, I., and Boccard, F. (2013). Chromosomal Organization and Segregation in *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS Genet.* *9*, e1003492.

- Vecchiarelli, A.G., Han, Y.-W., Tan, X., Mizuuchi, M., Ghirlando, R., Biertmpfel, C., Funnell, B.E., and Mizuuchi, K. (2010). ATP control of dynamic P1 ParA-DNA interactions: a key role for the nucleoid in plasmid partition. *Mol. Microbiol.* **78**, no-no.
- Vecchiarelli, A.G., Hwang, L.C., and Mizuuchi, K. (2013). Cell-free study of F plasmid partition provides evidence for cargo transport by a diffusion-ratchet mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **110**, E1390–E1397.
- Vietri Rudan, M., Barrington, C., Henderson, S., Ernst, C., Odom, D.T., Tanay, A., and Hadjur, S. (2015). Comparative Hi-C reveals that CTCF underlies evolution of chromosomal domain architecture. *Cell Rep.* **10**, 1297–1309.
- Viollier, P.H., Thanbichler, M., McGrath, P.T., West, L., Meewan, M., McAdams, H.H., and Shapiro, L. (2004). Rapid and sequential movement of individual chromosomal loci to specific subcellular locations during bacterial DNA replication. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 9257–9262.
- Wang, X., and Rudner, D.Z. (2014). Spatial organization of bacterial chromosomes. *Curr. Opin. Microbiol.* **22**, 66–72.
- Wang, X., Liu, X., Possoz, C., and Sherratt, D.J. (2006). The two *Escherichia coli* chromosome arms locate to separate cell halves. *Genes Dev.* **20**, 1727–1731.
- Wang, X., Reyes-Lamothe, R., and Sherratt, D.J. (2008). Modulation of *Escherichia coli* sister chromosome cohesion by topoisomerase IV. *Genes Dev.* **22**, 2426–2433.
- Wang, X., Tang, O.W., Riley, E.P., and Rudner, D.Z. (2014). The SMC condensin complex is required for origin segregation in *Bacillus subtilis*. *Curr. Biol.* **24**, 287–292.
- Wang, X., Le, T.B.K., Lajoie, B.R., Dekker, J., Laub, M.T., and Rudner, D.Z. (2015). Condensin promotes the juxtaposition of DNA flanking its loading site in *Bacillus subtilis*. *Genes Dev.* **29**, 1661–1675.
- Wang, X., Brandão, H.B., Le, T.B.K., Laub, M.T., and Rudner, D.Z. (2017). *Bacillus subtilis* SMC complexes juxtapose chromosome arms as they travel from origin to terminus. *Science* (80-). **355**, 524–527.
- Wilhelm, L., Bürmann, F., Minnen, A., Shin, H.-C., Toseland, C.P., Oh, B.-H., and Gruber, S. (2015). SMC condensin entraps chromosomal DNA by an ATP hydrolysis dependent loading mechanism in *Bacillus subtilis*. *Elife* **4**.
- Willemse, J., Borst, J.W., de Waal, E., Bisseling, T., and van Wezel, G.P. (2011). Positive control of cell division: FtsZ is recruited by SsgB during sporulation of *Streptomyces*. *Genes Dev.* **25**, 89–99.
- Wit, E. De, and Laat, W. De (2012). A decade of 3C technologies-insights into nuclear organization. *Genes Dev.* **11–24**.
- Worcel, A., and Burgi, E. (1972). On the structure of the folded chromosome of *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* **71**, 127–147.

- Wu, L.J., and Errington, J. (2004). Coordination of Cell Division and Chromosome Segregation by a Nucleoid Occlusion Protein in *Bacillus subtilis*. *Cell* *117*, 915–925.
- Yamaichi, Y., and Niki, H. (2000). Active segregation by the *Bacillus subtilis* partitioning system in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *97*, 14656–14661.
- Yamaichi, Y., and Niki, H. (2004). *migS*, a cis-acting site that affects bipolar positioning of *oriC* on the *Escherichia coli* chromosome. *EMBO J.* *23*, 221–233.
- Yamaichi, Y., Fogel, M.A., McLeod, S.M., Hui, M.P., and Waldor, M.K. (2007). Distinct Centromere-Like *parS* Sites on the Two Chromosomes of *Vibrio* spp. *J. Bacteriol.* *189*, 5314–5324.
- Yamaichi, Y., Bruckner, R., Ringgaard, S., Möll, A., Ewen Cameron, D., Briegel, A., Jensen, G.J., Davis, B.M., and Waldor, M.K. (2012). A multidomain hub anchors the chromosome segregation and chemotactic machinery to the bacterial pole. *Genes Dev.* *26*, 2348–2360.
- Youngren, B., Nielsen, H.J., Jun, S., and Austin, S. (2014). The multifork *Escherichia coli* chromosome is a self-duplicating and self-segregating thermodynamic ring polymer. *Genes Dev.* *28*, 71–84.
- Zawadzki, P., Stracy, M., Ginda, K., Zawadzka, K., Lesterlin, C., Kapanidis, A.N., and Sherratt, D.J. (2015). The Localization and Action of Topoisomerase IV in *Escherichia coli* Chromosome Segregation Is Coordinated by the SMC Complex, MukBEF. *Cell Rep.* *13*, 2587–2596.
- Zechiedrich, E.L., Khodursky, A.B., and Cozzarelli, N.R. (1997). Topoisomerase IV, not gyrase, decatenates products of site-specific recombination in *Escherichia coli*. *Genes Dev.* *11*, 2580–2592.

Titre : Etude de l'organisation et de la ségrégation des chromosomes chez *Pseudomonas aeruginosa*

Mots clés : *Pseudomonas aeruginosa* – chromosome – ségrégation – système ParABS – condensines bactériennes

Résumé : Au moment de la division cellulaire, l'ADN contenu dans les chromosomes doit être transmis de la cellule mère à chacune des cellules filles. Pour cela l'ADN est d'abord copié (réplication de l'ADN) puis séparé (ségrégation des chromosomes) dans chacune des cellules filles. Chez les eucaryotes, cette séparation se fait lors de la mitose c'est à dire après que les chromosomes soient complètement répliqués. Chez les bactéries qui en général possède un unique chromosome circulaire, cette ségrégation du chromosome se fait au fur et à mesure de la réplication et deux grands types d'acteurs sont souvent impliqués dans ce processus : Les condensines bactériennes (de type SMC) et les systèmes de partition (ParABS).

Les systèmes de partition sont composés de deux protéines ParA et ParB et de séquences ADN spécifiquement reconnues par ParB nommées *parS*. Ces séquences sont en nombres variables selon les espèces et sont souvent localisées proches de l'origine de réplication (*oriC*) sur le chromosome. Pendant ma thèse, je me suis intéressée à l'importance de ces séquences et à l'importance de leur positionnement sur le chromosome de *Pseudomonas aeruginosa*.

J'ai pu montrer qu'un seul site *parS* suffit pour une ségrégation correcte du chromosome, s'il est situé dans une région s'étendant de -200 à + 450 kb autour d'*oriC*. Les limites de cette région appelée « zone de compétence » seraient liées à la distance *oriC-parS* et son asymétrie serait due à la présence de l'opéron ribosomique *rrnD* à 220 kb à gauche d'*oriC*. En plus de donner une meilleure compréhension de la ségrégation chez *P. aeruginosa*, cette partie du projet a permis de mettre en évidence un lien entre *oriC* et sites *parS* qui pourrait expliquer leurs localisations proches sur le chromosome.

Je me suis également intéressée au complexe SMC-ScpAB et à son rôle dans la ségrégation du chromosome chez *P. aeruginosa*. J'ai montré que si SMC n'a pas un rôle majeur dans la ségrégation du chromosome, il est important pour le positionnement du chromosome dans la cellule. J'ai aussi mis en évidence un lien entre SMC et le système ParABS en étudiant l'effet du déplacement d'un site *parS* sur l'organisation et la ségrégation du chromosome.

Title : Study of the organization and the segregation of *Pseudomonas aeruginosa* chromosome

Keywords : *Pseudomonas aeruginosa* - Chromosome – Segregation – ParABS - bacterial condensins

Abstract: When a mother cell is dividing, DNA inside chromosomes needs to be transmitted to daughter cells. For that, the DNA is copied (replication) and the two copies are separated in each daughter cell (segregation). In eukaryotes this separation occurs during mitosis after complete replication of DNA. In a bacterium, which in general has a unique and circular chromosome, segregation occurs concomitantly with replication and two main actors are often involved in this segregation: SMC complexes and partition systems (ParABS).

A partition system contains 3 elements: two proteins ParA and ParB and DNA sequences named *parS*. These sequences are highly conserved and are found in variable numbers depending on bacteria. Their chromosomal localization is almost always close to *oriC*. During my thesis I worked on the importance of these sequences and on the importance of their chromosomal localization for the functioning of ParABS in *Pseudomonas aeruginosa*.

I have shown that one *parS* site is enough for correct chromosome segregation if it is located between -200 and +450 kb around *oriC*. Limits of this region called "zone de compétence" are probably linked with the distance between *oriC-parS*. The asymmetry of the "competence zone" is probably due to the presence of a ribosomal operon (*rrnD*) at -220kb. This part of the project allow us to understand better chromosome segregation in *P. aeruginosa* but also to highlight a functional link between *oriC* and *parS* which can explain why this sequences are located close from each other on the chromosome in lots of bacteria.

I also studied the SMC-ScpAB complex and its role in chromosome segregation. For that I analyzed the conformation and segregation of a Δsmc mutant. I highlighted a link between SMC-ScpAB and ParABS system by characterization of mutants with *parS* displaced on the chromosome.