

Table des matières

1	Introduction : Une information génétique organisée et structurée chez les bactéries	1
1.1	Réplication du génome bactérien	2
1.1.1	Le cycle de réplication du chromosome bactérien	2
1.1.2	La réplication multiple	3
1.1.3	La réplication est à la base de l'organisation du génome bactérien	5
1.1.4	L'orientation de certains motifs d'ADN facilite la ségrégation ou la réparation des chromosomes	8
1.1.5	Coordination entre réplication et ségrégation	9
1.1.6	Coordination entre réplication, ségrégation et division	9
1.2	Structure des chromosomes bactériens	13
1.2.1	Compaction du nucléoïde bactérien	13
1.2.2	Les macrodomaines	21
1.3	Différents modèles et mécanismes de ségrégation des chromosomes	24
1.3.1	Différentes techniques d'études	24
1.3.2	Différents modèles bactériens d'organisation spatiale du chro- mosome	28
1.3.3	Les mécanismes de ségrégation des chromosomes	32
1.4	Les bactéries possédant plusieurs chromosomes	41
1.4.1	Plusieurs chromosomes, un intérêt d'étude	41
1.4.2	<i>Vibrio cholerae</i> comme modèle de cette étude	41
1.4.3	Un modèle abordable	45
1.4.4	les <i>Vibrionaceae</i> , un intérêt médical et environnemental	45
2	L'impact des sites <i>parSI</i> et <i>oriCI</i> sur l'organisation du chromosome I de <i>Vibrio cholerae</i>	47
2.1	Introduction	48
2.2	The two cis-acting sites, <i>parS1</i> and <i>oriC1</i> , contribute to the longitu- dinal organisation of <i>Vibrio cholerae</i> chromosome I	50
2.2.1	Abstract	51
2.2.2	Introduction	51
2.2.3	Results	53
2.2.4	Discussion	58
2.2.5	Material and Methods	62
2.2.6	Acknowledgments	62
2.2.7	References	62
2.2.8	Figures	66
2.2.9	Supplementary Materials, TextS1	70
2.2.10	Supplementary References	72

2.2.11	Supplementary Tables	73
2.2.12	Supplementary Figures	75
2.3	Discussion	90
3	Les régions terminales soeurs du chromosome II de <i>Vibrio cholerae</i> entrent en contact durant la division	93
3.1	Introduction	94
3.2	<i>Vibrio cholerae</i> chromosome II sister terminus regions contact each other during cell division	96
3.2.1	Abstract	97
3.2.2	Introduction	97
3.2.3	Results and discussion	98
3.2.4	Material and methods	101
3.2.5	Acknowledgments	102
3.2.6	References	102
3.2.7	Figures	105
3.2.8	Supplementary Materials	109
3.2.9	Supplementary Tables	110
3.2.10	Supplementary References	114
3.2.11	Supplementary Figures	115
3.3	Discussion	120
4	Films de croissance	123
4.1	Contraintes techniques	123
4.2	Analyse d'un film de croissance	126
4.3	Analyse des timelapses dans le futur	130
5	Matériels et Méthodes	131
5.1	Souches de <i>Vibrio cholerae</i>	131
5.2	Liste des plasmides	137
5.3	Transformation naturelle	138
5.4	Protocoles de Microscopie	138
5.5	Analyse d'images statiques par MicrobeTracker	139
6	Discussion générale	141
	Bibliographie	145

Introduction : Une information génétique organisée et structurée chez les bactéries

Sommaire

1.1	Réplication du génome bactérien	2
1.1.1	Le cycle de réplication du chromosome bactérien	2
1.1.2	La réplication multiple	3
1.1.3	La réplication est à la base de l'organisation du génome bactérien	5
1.1.4	L'orientation de certains motifs d'ADN facilite la ségrégation ou la réparation des chromosomes	8
1.1.5	Coordination entre réplication et ségrégation	9
1.1.6	Coordination entre réplication, ségrégation et division	9
1.2	Structure des chromosomes bactériens	13
1.2.1	Compaction du nucléoïde bactérien	13
1.2.1.1	Le super-enroulement négatif	14
1.2.1.2	Les protéines NAP "Nucleoid Associated Proteins"	17
1.2.1.3	Le complexe SMC, Structural Maintenance of Chro- mosomes	20
1.2.2	Les macrodomaines	21
1.3	Différents modèles et mécanismes de ségrégation des chro- mosomes	24
1.3.1	Différentes techniques d'études	24
1.3.1.1	Techniques de microscopie	24
1.3.1.2	Techniques d'analyse génomiques	25
1.3.2	Différents modèles bactériens d'organisation spatiale du chro- mosome	28
1.3.2.1	<i>Bacillus subtilis</i>	28
1.3.2.2	<i>Caulobacter crescentus</i>	28
1.3.2.3	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	30
1.3.2.4	<i>Escherichia coli</i>	32
1.3.3	Les mécanismes de ségrégation des chromosomes	32
1.3.3.1	Ségrégation des Origines	33
1.3.3.2	Ségrégation du reste du chromosome	38
1.3.3.3	Ségrégation du Terminus	39
1.4	Les bactéries possédant plusieurs chromosomes	41

1.4.1	Plusieurs chromosomes, un intérêt d'étude	41
1.4.2	<i>Vibrio cholerae</i> comme modèle de cette étude	41
1.4.2.1	La réplication des deux chromosomes	42
1.4.2.2	Des ségrégations différentes pour les deux chromosomes	43
1.4.2.3	Communication entre la réplication et la ségrégation	44
1.4.3	Un modèle abordable	45
1.4.4	les <i>Vibrionaceae</i> , un intérêt médical et environnemental . . .	45

Les bactéries sont des organismes unicellulaires étudiés de façon intensive depuis des décennies afin de comprendre les mécanismes de base de gestion de l'ADN tels que la réplication, la transcription ou la recombinaison qui sont communs à toutes les cellules vivantes. Longtemps leur petite taille et l'absence de techniques permettant de les observer en détails ont fait défaut à la recherche, empêchant une meilleure compréhension du monde qui nous entoure. Plus particulièrement, rien ne nous permettait d'étudier les mécanismes d'organisation de l'information génétique pourtant indispensables à une bonne hérédité et à une pérennité des espèces. Chez les organismes eucaryotes ("vrai noyau"), l'ADN est confiné dans un noyau au sein de la cellule, ce qui permet de séparer la transcription de la traduction. Les bactéries étant des procaryotes ("avant noyau"), elles sont dépourvues de noyau et les chercheurs ont longtemps pensé que leur génome pouvait donc se déplacer librement dans le cytosol. Mais il semblait étrange qu'une bactérie puisse se multiplier rapidement, et donc faire au moins une copie de son génome, si celui-ci était complètement désordonné et enroulé sur lui-même. Les bactéries étudiées à ce jour ont pour la plupart un génome contenu sur un chromosome circulaire dont la taille varie entre 2 et 8 Mb (Mégabases). Si cet ADN était décondensé et étiré sur toute sa longueur, il serait supérieur à 1mm de long, la taille des bactéries impose donc une compaction de l'ordre de 10^3 . Il est donc indispensable de condenser ce chromosome ainsi que de l'organiser afin de permettre à la cellule d'avoir un mouvement de l'ADN possible et nécessaire pour que la transcription d'ARN et la réplication d'ADN puissent se faire sans problèmes ; et nous verrons par la suite que cette condensation et cette organisation de l'information génétique sont intimement liées au cycle cellulaire de la cellule et à la ségrégation (la séparation) des chromosomes soeurs lors de la division.

1.1 Réplication du génome bactérien

1.1.1 Le cycle de réplication du chromosome bactérien

Chez les eucaryotes comme chez les procaryotes, les cellules grandissent puis se divisent, et donnent des cellules filles capables de faire de même. Il est important de transmettre aux cellules-filles la même information génétique, car si l'une en obtient trop et l'autre trop peu, cela affectera la survie de cette dernière et donc de l'espèce. Chez les eucaryotes, entre deux divisions le cycle cellulaire passe par plusieurs étapes : il y a une phase G1 de "repos" après la division cellulaire précédente, une

phase S de réplication pendant laquelle le contenu en ADN de la cellule double, une phase G2 de préparation à la division cellulaire pendant laquelle l'ADN se condense en chromosomes puis la phase de division M. Chez les bactéries les phases sont nommées différemment : I ou B pour la phase G1, C pour la phase S et D pour les phases G2 et M. Toutes les cellules passent par ces quatre (ou trois pour les procaryotes) étapes différentes du cycle cellulaire, dans cet ordre. Le cycle chromosomique est cependant différent entre les deux domaines du vivant. Les chromosomes eucaryotes suivent un cycle de réplication-condensation-ségrégation-(division cellulaire)-décondensation, dans cet ordre et une seule fois par cycle cellulaire. Or il est devenu très clair que contrairement aux étapes strictement consécutives des chromosomes eucaryotes, les chromosomes procaryotes ont un cycle pendant lequel toutes ces étapes se déroulent en même temps. En effet, les bactéries font une ségrégation progressive de leur chromosome, au fur et à mesure de la réplication, et ces deux étapes du cycle chromosomique se font à la même vitesse. Les cellules eucaryotes ont des "checkpoints" pendant le cycle cellulaire afin de vérifier que le cycle chromosomique est coordonné, ceci pour éviter une mauvaise répartition de l'information génétique. Nous verrons que le cycle cellulaire et le cycle chromosomique chez les bactéries sont coordonnés également.

1.1.2 La réplication multiple

Alors que la réplication des chromosomes eucaryotes est initiée à plusieurs origines en même temps, chez les bactéries il n'y a qu'une seule origine de réplication par chromosome. Celle-ci initie un seul oeil de réplication qui est responsable de la réplication de tout le chromosome. Néanmoins, dans les meilleures conditions de croissance, *E. coli*, la bactérie la plus étudiée, est capable de se diviser toutes les 20 minutes environ, alors que le temps nécessaire pour répliquer son chromosome en entier est d'environ 40 minutes [Bremer & Dennis 1987]. Pour surmonter ce retard, *E. coli* est capable d'initier une nouvelle réplication à partir de la même origine, en parallèle de la première, c'est l'over-réplication ou la réplication en multi-fourche (voir figure 1.1, p.3). De fait, les cellules d'*E. coli* capables de se multiplier le plus vite peuvent avoir de 8 à 16 Origines de réplication à la fois, ce qui veut dire qu'elles peuvent avoir jusqu'à 4 cycles chromosomiques se chevauchant [Morigen *et al.* 2009]. D'autres bactéries sont capables de se diviser plus vite qu'il ne leur faut de temps pour répliquer leur chromosome, on peut citer entre autre *B. subtilis* [Quinn & Sueoka 1970] et *V. cholerae* [Stokke *et al.* 2011].

Découplage du cycle chromosomique et du cycle de division Une des explications quant à la sélection de cette capacité à initier plusieurs cycles de réplication est peut être la possibilité ainsi donnée aux bactéries de déconnecter temporairement le cycle chromosomique du cycle cellulaire. Ainsi si la division cellulaire est bloquée pour une quelconque raison, les bactéries continuent de croître sans pouvoir se diviser et deviennent filamenteuses. L'over-réplication permet aux bactéries de remplir ces cellules filamenteuses avec des nucléoides complets comme observé chez *E. coli*

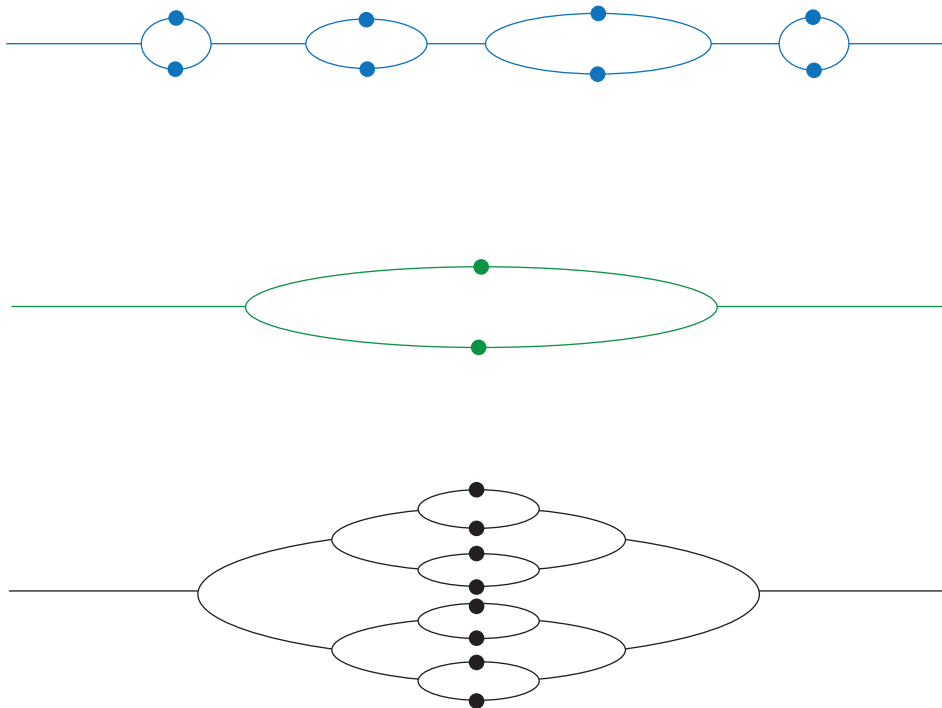


FIGURE 1.1 – Formats de réplication eucaryotes versus prokaryotes; *en bleu* : la réplication eucaryote est initiée à plusieurs origines en même temps. *en vert* : un seul oeil de réplication chez les prokaryotes en milieu minimum *en noir* : la réplication multiple chez les prokaryotes capables d'initier des réplifications en parallèle

[Visvalingam *et al.* 2012], [Tanaka *et al.* 1976]. Une fois que la division cellulaire est débloquée ou devient avantageuse, les cellules filamenteuses contenant plusieurs nucléoides pourront se diviser en cellules individuelles avec un seul nucléoïde.

Le dosage des gènes Quand le temps nécessaire pour répliquer le chromosome est plus long que le temps de division, le dosage des gènes près de l'Origine augmente de façon exponentielle avec le nombre de réplifications multiples lancées en parallèle. Les bactéries capables de se multiplier rapidement, comme *E. coli* et *B. subtilis*, grâce à des cycles de réplication simultanés, accumulent et sélectionnent des gènes hautement exprimés près de l'Origine de réplication à cause de cet effet. Des bactéries ayant un temps de réplication largement suffisant pour répliquer leur chromosome, comme *C. crescentus* qui a un temps de multiplication de 90 min. n'ont pas ce biais dans la distribution des gènes hautement exprimés sur le chromosome. Alors que les effets du dosage des gènes n'ont été que rarement étudiés, ils ont été souvent invoqués pour expliquer les effets délétères des réarrangements du chromosome [Liu & Sanderson 1996], [Roth *et al.* 1996]. En effet, des inversions expérimentales sur le chromosome d'*E. coli* modifiant la distance de certains gènes à l'Origine, ont provoqué un ralentissement de la vitesse de croissance [Louarn *et al.* 1985].

1.1.3 La répllication est à la base de l'organisation du génome bactérien

La plupart des bactéries étudiées possèdent un unique chromosome circulaire. La répllication commence à l'Origine, et les deux fourches de réplifications se déplacent le long des bras du chromosome, les réplichores. Chacune réplique les deux brins d'ADN. La vitesse à laquelle ces fourches progressent varie énormément d'une espèce à l'autre : elle est de 1000 nucléotides à la seconde chez *E. coli* alors qu'elle n'est que de 100 nucléotides à la seconde chez *Mycoplasma capricolum*. Les fourches de réplifications s'arrêtent lorsqu'elles entrent en collision à l'opposé de l'origine sur le chromosome, au Terminus. Chez *E. coli*, des séquences *ter* auxquelles se fixent les protéines Tus permettent d'empêcher les fourches de répllication de passer le terminus et de commencer à répliquer l'autre réplichore [Bussiere & Bastia 1999]. Le système d'arrêt des fourches varie entre les bactéries, et la délétion des sites *ter* n'est pas létale chez *B. subtilis* [Iisma & Wake 1987] ou chez *E. coli* [Henson & Kuempel 1985].

La fourche de répllication L'élongation des brins d'ADN nouvellement synthétisés implique le déplacement des fourches de répllication le long du chromosome. Le complexe de polymérisation est composé de plusieurs enzymes [Glover & McHenry 2001] : on trouve entre autres une hélicase qui déroule le chromosome (DnaB chez *E. coli*) et des ADN-polymérases qui répliquent chacune un brin d'ADN. Les ADN-polymérases sont constituées de la sous unité α (pour l'activité de polymérase), de la sous unité θ (qui vérifie l'activité d'exonucléase 3'→5'), et la sous unité τ qui permet à l'ADN polymérase de dimériser [Marians 1992]. Parce que

l'ADN (de part sa composition et sa conformation) est orienté et que la polymérisation se fait dans le sens $5' \rightarrow 3'$, un brin est synthétisé de façon continue, c'est le brin "direct" ou "leading strand", et l'autre brin est synthétisé en plusieurs étapes grâce à l'utilisation de fragments d'Okazaki, c'est le brin "retardé" ou "lagging strand". L'ADN polymérase commence la synthèse de ces fragments d'Okazaki (qui font une taille entre 1000 et 2000 nucléotides chez *E.coli*) à partir d'amorces d'ARN synthétisées par l'ARN polymérase [Kitani *et al.* 1985]. Les amorces seront enlevées par une RNase et les espaces laissés seront complétés par des ADN polymérases dédiées (voir figure 1.2,p.6).

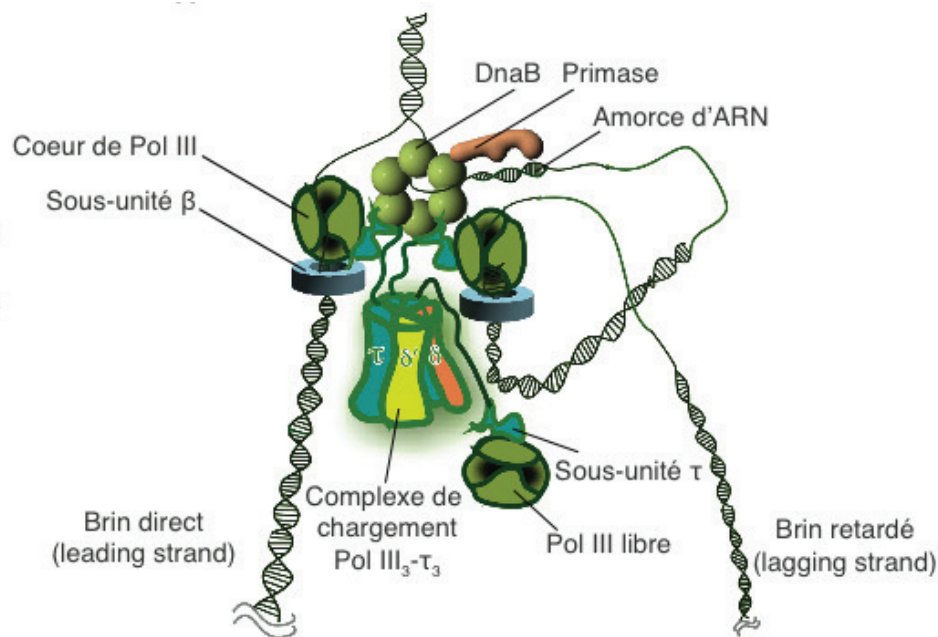


FIGURE 1.2 – Complexe de réplication chez *E. coli* : l'hélicase DnaB ouvre l'ADN non répliqué, pour que les ADN polymérases puissent synthétiser les brins complémentaires du brin direct (leading strand) et du brin retardé (lagging strand). Les trois polymérases sont identiques et composées d'un coeur (sous unité α) qui a une activité de polymérase, d'une sous unité τ qui connecte les deux ADN polymérases (seule la partie C-terminale est représentée ici), la sous unité β est formé d'un dimère en forme d'anneau, qui empêche les polymérases de se dissocier de l'ADN. Tiré de [McInerney *et al.* 2007]

Ainsi, il y a dans chaque complexe de polymérisation, trois ADN-polymérases qui répliquent les brins d'ADN. Chez *E. coli*, les trois polymérases sont interchangeables et peuvent répliquer le brin leading ou le brin lagging [Yuzhakov *et al.* 1996].

Un biais dans la composition des deux brins La réplication du chromosome se fait fréquemment à des moments où la transcription est forte, des collisions entre

l'ADN polymérase et l'ARN polymérase sont donc inévitables. Parce que les deux polymérases progressent dans le sens 5'→3', si la transcription se fait sur le brin lagging, la collision est inévitable. Si la transcription se fait sur le brin leading, il y a collision dans 95% des cas, car l'ADN polymérase est 20 fois plus rapide que l'ARN polymérase. Dans le premier cas on parle de collision frontale, dans le second de collision coorientée. Ceci provoque une asymétrie entre les deux brins et la probabilité de collision (et sa résolution!) dépend donc de la direction de la transcription : des études chez *E. coli* [French 1992] et *Saccharomyces cerevisiae* [Deshpande & Newlon 1996] ont montré que seules les collisions frontales affectent de façon significative la progression de la fourche de réplication. Ainsi, la probabilité des collisions a mené au fil de l'évolution à une pression sélective vers le codage des gènes les plus fréquemment transcrits sur le brin leading. Ceci apporte plusieurs avantages : (1) une réplication de l'ADN plus rapide (2) moins de perte de transcription (3) une diminution du nombre d'arrêts de la fourche de réplication, qui sont dangereux pour la cellule [Kuzminov 2011]. D'ailleurs, des gènes hautement exprimés en relation avec la transcription comme par exemple les ARN ribosomaux (ARNr) ou les gènes codant pour les protéines ribosomales ont systématiquement été trouvés sur le brin leading des génomes [Zeigler & Dean 1990], [Blattner *et al.* 1997], [Rocha 2002].

De la même façon, les gènes essentiels sont plus fréquemment sur le brin leading, car l'arrêt de la transcription dû à une collision frontale pourrait produire des protéines tronquées, ce qui serait particulièrement délétère pour les cellules [Tao *et al.* 1999]. Cette organisation participe probablement à obliger les fourches de réplication à s'arrêter une fois arrivées au terminus : si elles continuent à répliquer le chromosome après l'avoir passé, les gènes ne sont plus dans la bonne orientation et les collisions frontales avec l'ARN polymérase deviennent très fréquentes, finissant par provoquer l'arrêt de la fourche [Rudolph *et al.* 2013]. Ceci est visible sur des données d'analyse de fréquence de marqueurs à haut débit, où dans une souche sauvage l'arrêt de la réplication au site *dif* est net [Rudolph *et al.* 2013]. Mais l'insertion de mutations Δtus (qui élimine les barrières Tuster) et *rpoB*35* (qui déstabilise le complexe de transcription) montre une région de terminaison plus large. Ces mutations montrent que les deux systèmes fonctionnent de concert pour assurer un arrêt de la réplication à un endroit précis [Rudolph *et al.* 2013].

Ainsi, parmi les contraintes imposées par la réplication sur la distribution des gènes sur le chromosome bactérien, l'expression joue un rôle dans la distribution des gènes en fonction de leur distance à l'Origine, alors que le caractère essentiel des gènes joue un rôle dans leur répartition sur un brin d'ADN ou l'autre.

Plusieurs études ont cherché à comprendre le biais qu'on peut trouver dans la composition en nucléotides des deux brins : en effet, le brin leading est plus riche en G qu'en C et (à un degré moins élevé) plus riche en T qu'en A [Lobry 1996], [Francino & Ochman 1997], [Karlin 1999]. D'ailleurs, calculer le biais en GC (en calculant $(G-C)/(G+C)$ dans des fenêtres glissantes) est devenu une des méthodes standard pour identifier l'Origine et le Terminus de réplication dans beaucoup de bactéries [Grigoriev 1998]. La source majeure de cette asymétrie est à trouver dans les pro-

priétés fondamentales de l'ADN, telles que sa stabilité chimique par exemple. L'hypothèse la plus probable est celle de l'instabilité de la cytosine [Frank & Lobry 1999]. Comparée à un ADN double brin, dans un ADN simple brin la déamination de la cytosine est 140 fois plus fréquente. Le brin lagging étant le plus exposé en simple brin, des mutations C→T peuvent provoquer un biais en GC et en TA.

1.1.4 L'orientation de certains motifs d'ADN facilite la ségrégation ou la réparation des chromosomes

Il a été montré que l'orientation de certains motifs d'ADN servait à guider la ségrégation des chromosomes : la protéine FtsK, conservée dans toutes les bactéries étudiées à ce jour, a été découverte d'abord parce qu'elle permet de séparer les dimères de chromosome qui peuvent se former si la réparation par recombinaison provoque un nombre de crossover impair. Cela pose problème à la cellule car le dimère va rester coincé au septum, et la division risque de provoquer une perte d'information génétique. Pour éviter cela, FtsK reconnaît des séquences KOPS (pour "FtsK-Oriented Polar Sequences"), que l'on retrouve sur les deux réplichores et qui, de part leur orientation, pointent vers le terminus. Ainsi, FtsK qui est située au septum, est activée au moment de la formation du septum, et si de l'ADN est présent en cas de dimère, FtsK va reconnaître les KOPS [Bigot *et al.* 2005] et transloquer l'ADN de façon à ramener les termini et le site *dif* de résolution des dimères, au septum. FtsK active ensuite des recombinases XerC et XerD qui provoquent un crossover supplémentaire au niveau des deux sites *dif* permettant de convertir le dimère en deux monomères [Aussel *et al.* 2002]. Il a été montré récemment que FtsK n'agit pas seulement en cas de dimères de chromosomes, mais participe activement à la ségrégation des régions autour du Terminus des chromosomes, dans la plupart (voire même toutes) les cellules en division chez *E. coli* [Stouf *et al.* 2013]. Ainsi, l'orientation des séquences KOPS permet d'orienter la translocation de l'ADN par FtsK et de ségréger activement les chromosomes-soeurs.

La recombinaison homologue chez *E. coli* est stimulée au niveau de séquences d'ADN appelées les sites χ (Chi) (5'-GCTGGTGG-3') [Lam *et al.* 1974], [Stahl *et al.* 1975], [Smith *et al.* 1981]. La stimulation requiert l'enzyme RecBCD, qui remplit plusieurs fonctions, dont celles d'hélicase et d'exonucléase 3'→5'. Lorsqu'il y a des cassures doubles-brins dans le chromosome, RecBCD vient se fixer aux extrémités double-brins d'ADN. Elle déroule ensuite le duplexe d'ADN et dégrade le brin avec une extrémité 3' (le brin 5' est également dégradé mais dans une moindre mesure) [Dixon & Kowalczykowski 1993]. Quand une séquence χ est reconnue par une enzyme RecBCD en train de transloquer sur l'ADN, la dégradation du brin 3' s'arrête à environ 4-5 nucléotides en amont du site χ , mais RecBCD continue de relaxer l'ADN [Dixon & Kowalczykowski 1993]. La relaxation du duplexe d'ADN en aval du site χ permet de produire un substrat d'ADN simple brin qui peut ensuite être utilisé par la protéine RecA pour la recombinaison homologue [Dixon & Kowalczykowski 1991]. RecA est probablement la seule enzyme essentielle pour la recombinaison homologue chez *E. coli*. En effet, la mutation du gène *recA* entraîne une réduction de la

recombinaison homologue de l'ordre de 10^4 à 10^5 [Clark & Margulies 1965]. Ainsi, l'orientation des séquences χ permet d'obtenir à partir d'une cassure double brin des substrats qui pourront être utilisés par RecA pour la réparation par recombinaison homologue.

1.1.5 Coordination entre réplication et ségrégation

La ségrégation apparemment rapide des Origines répliquées (expliquée plus en détail par la suite) a conduit à la recherche de séquences spécifiques expliquant ce processus. Une séquence de 16 bp a été identifiée sur le chromosome de *B. subtilis* [Lin & Grossman 1998]. Cette séquence fait partie du système de partition de la cellule, et il est intéressant de constater que les 10 exemplaires de cette séquence qu'on trouve sur le chromosome sont tous proches de l'Origine. Les mécanismes de partitions sont décrits plus en détails dans la partie 1.3.3.1, p.33. Chez *E. coli*, qui ne possède aucun système de partition connu à ce jour, des analyses du génome ont montré que les gènes hautement exprimés placés de façon asymétrique à l'Origine peuvent provoquer un mécanisme de ségrégation. Cela pourrait venir de la force motrice de l'ARN polymérase (dont les mouvements sont restreint dans la cellule), qui pourrait séparer les Origines en transcrivant ces gènes hautement exprimés [Dworkin & Losick 2002], [Rocha *et al.* 2003].

Tout ceci suggère une grande connexion entre la réplication, la ségrégation, la transcription et la structure même du chromosome.

1.1.6 Coordination entre réplication, ségrégation et division

Il existe plusieurs systèmes selon les espèces bactériennes afin de s'assurer que la division cellulaire se fait au centre, sans couper un chromosome, de façon à avoir une répartition de l'information génétique équitable entre les deux cellules-filles. Chez les bactéries, la division cellulaire se fait grâce à la protéine FtsZ [Bi & Lutkenhaus 1991], [Adams & Errington 2009]. FtsZ polymérise en filaments de façon GTP-dépendante lesquels se combinent pour former un anneau de septation appelé l'anneau Z qui dirige la division cellulaire [Bi & Lutkenhaus 1991]. L'assemblage de cet anneau est affecté par de nombreuses protéines qui ont pour rôle de s'assurer qu'il se forme au bon endroit au bon moment [Adams & Errington 2009], [Margolin 2005], [Romberg & Levin 2003]. Deux composants clés des systèmes de régulation, les système Min et NO (pour "Nucleoid Occlusion"), s'assurent que l'anneau-Z ne se forme pas aux pôles et où l'ADN chromosomique respectivement [Raskin & de Boer 1999], [Lutkenhaus 2007], [Bernhardt & de Boer 2005].

Le système Min inhibe la polymérisation de FtsZ aux pôles et joue un rôle dans la ségrégation des chromosomes soeurs Chez *E. coli*, le système MinCDE crée un gradient d'inhibition de FtsZ aux pôles [Lutkenhaus 2007] : MinD possède un domaine C-terminal amphiphile, ce qui lui permet de se lier à la membrane sous forme de filaments de façon ATP-dépendante [Hu *et al.* 2002],

[Szeto *et al.* 2002]. MinD montre une oscillation entre les deux pôles dans la cellule. Ces oscillations viennent d'une part de l'association ATP-dépendante de MinD avec la membrane et la polymérisation qui suit, et d'autre part du relargage local de MinD suite à l'hydrolyse de l'ATP stimulée par MinE. [Hu *et al.* 2002], [Lackner *et al.* 2003], [Kruse *et al.* 2007]. Ces oscillations créent un gradient intracellulaire entre le complexe MinD et l'inhibiteur de la division cellulaire MinC, avec un minimum au milieu de la cellule et un maximum aux pôles (voir figure 1.3,p.11).

Une étude récente a montré que MinD peut attacher l'ADN à la membrane de façon ATP-dépendante. La capacité de MinD à se fixer à l'ADN non-spécifique ainsi qu'à la membrane pourrait créer un gradient dynamique de sites d'attachement à l'ADN dans la membrane qui bouge progressivement du milieu de la cellule au pôle à chaque cycle d'oscillation. L'attachement et le détachement successif de segments du chromosome à ces sites pourrait éventuellement biaiser la ségrégation des chromosomes soeurs vers les pôles dans un mouvement Brownien sans retour en arrière possible [Ventura *et al.* 2013]. De plus, si le système Min est impliqué dans la ségrégation des chromosomes, on peut s'attendre à observer des défauts de ségrégation, tels que des cellules filamenteuses ou anuclées. De fait, en enlevant le système Min du génome d'*E. coli*, on observe des mini-cellules anuclées, à cause de divisions aberrantes proches des pôles. Néanmoins, les cellules n'étant que $\Delta minC$ ont une meilleure séparation des nucléoides que les cellules auxquelles on a enlevé tout le système, ce qui est une preuve supplémentaire de l'implication de MinD dans la ségrégation des chromosomes-soeurs, indépendamment de sa fonction de placement du site de division [Ventura *et al.* 2013] (voir figure 1.4,p.12).

Le système d'Occlusion du Nucléotide empêche une division précoce

Alors que les effets de ce système sont bien connus, ce n'est que récemment que des études ont permis de mettre à jour les protéines impliquées dans ce processus. Chez le modèle des bactéries à Gram-positif *Bacillus subtilis*, on trouve la protéine Noc [Wu & Errington 2004], alors que les bactéries à Gram-négatif comme *Escherichia coli* ont une protéine appelée SlmA [Bernhardt & de Boer 2005]. Des études récentes ont montré que SlmA se lie directement à FtsZ et que cette interaction empêche toute formation de l'anneau Z si SlmA est également lié à des sites d'ADN palindromiques de 12 bp [Tonthat *et al.* 2011], [Cho *et al.* 2011]. De façon intéressante, chez *E. coli*, les 50 sites identifiés sont situés sur tout le chromosome sauf autour du Ter. Le domaine autour du Ter est le dernier à être répliqué et sa ségrégation n'intervient que juste avant la division cellulaire [Éspeli *et al.* 2008]. Ainsi, lorsque la réplication arrive au Ter, celui-ci se trouve au centre de la cellule car la ségrégation des autres régions du chromosome vers les pôles est déjà bien avancée. Ce n'est donc que lorsqu'il ne reste plus que le Ter au septum et que SlmA n'est plus au centre de la cellule (car fixée sur des sites de 12bp partout sauf au Ter) que l'assemblage de l'anneau Z et la division peuvent commencer (voir figure 1.5,p.13). Tout comme SlmA, la protéine Noc se lie aussi à des séquences d'ADN spécifiques distribuées sur tout le chromosome sauf dans le domaine autour du Ter-

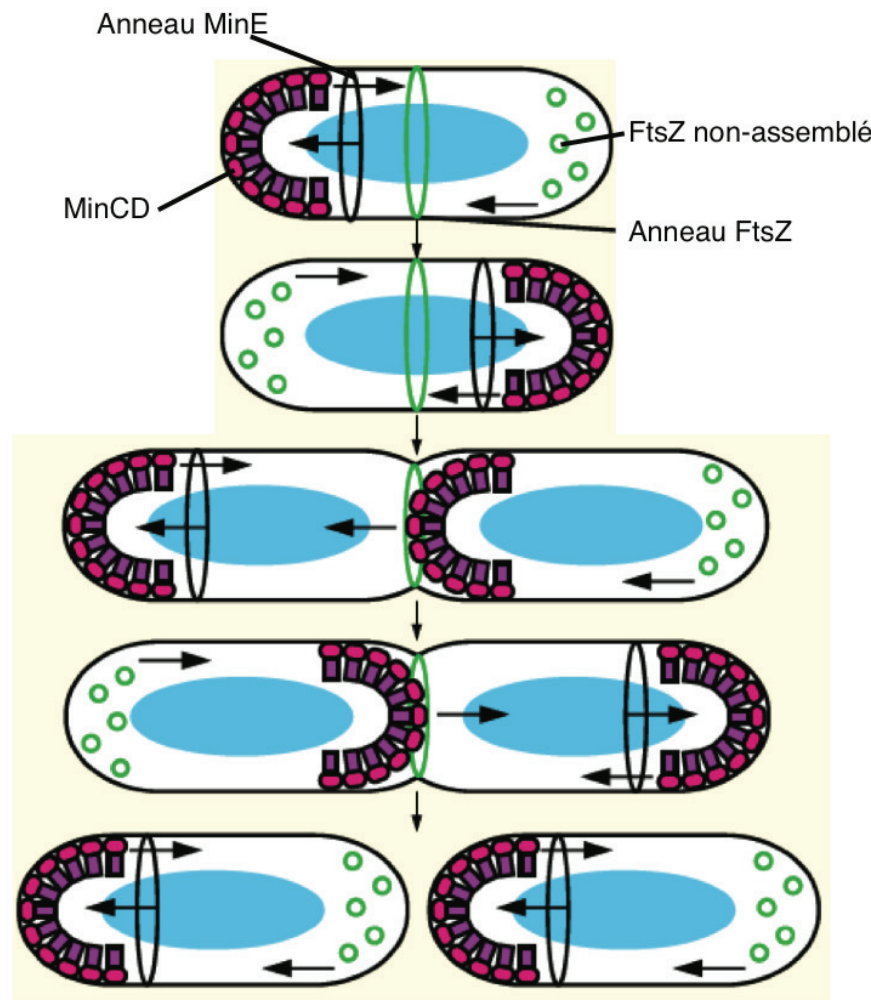


FIGURE 1.3 – Chez *E. coli*, MinE migre vers les complexes MinC-MinD à un pôle et stimule l'activité ATPase de MinD, ce qui fait migrer MinC et MinD au pôle opposé. Les protéines FtsZ non polymérisées sous forme d'anneau oscillent de la même façon, en réponse à MinC. Lorsqu'une cellule approche de la division, MinC et MinD font une pause au septum, peut-être pour préparer distribution équitable dans les cellules-filles et peut-être aussi pour aider à la constriction de l'anneau Z. Enfin, la cellule se divise et chaque cellule-fille possède son propre système oscillant Min. Nucléotide représenté en bleu. Tiré de [Rowlett & Margolin 2013].

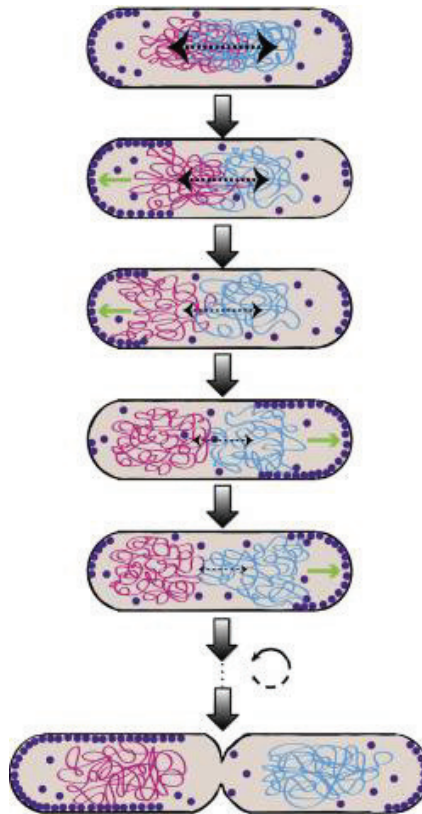


FIGURE 1.4 – **Modèle putatif de ségrégation des chromosomes par le système Min** : Le modèle montre une cellule d'E. coli se divisant en milieu minimum (de haut en bas). Seuls MinD (points violets) et un brin d'ADN (en rose et bleu) sont représentés pour des raisons de simplicité. Les forces répulsives entropiques qui séparent les deux chromosomes sont représentées par des flèches pointant vers les pôles, pendant que l'action du système Min qui crée un gradient oscillatoire de sites de fixation de l'ADN est représenté par des flèches vertes pointant vers un pôle pendant un cycle de l'oscillation. Tiré de [Ventura *et al.* 2013].

minus [Wu & Errington 2004], [Wu *et al.* 2009]. Ces séquences sont des palindromes de 14 bp et chez *B. subtilis*, il existe 74 sites sur le chromosome. Néanmoins, à ce jour aucune interaction de Noc avec FtsZ n'a été démontrée. Cependant, le positionnement des sites de fixation de Noc sur le chromosome laisse penser que Noc chez *B. subtilis* joue le même rôle que SlmA chez *E. coli*. Ainsi, même si les deux protéines n'ont pas d'homologie de séquence, elles semblent avoir les mêmes propriétés et préviennent les Occlusions du Nucléotide en n'autorisant la division que à la fin de la ségrégation.

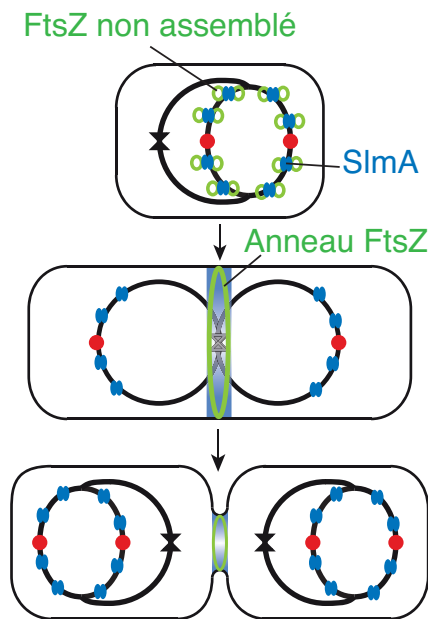


FIGURE 1.5 – **Modèle d'Occlusion du Nucléotide par SlmA chez *E. coli*** : Le modèle montre une cellule d'*E. coli* se divisant en milieu riche (de haut en bas). Le chromosome (en noir) se réplique de façon multiple. Les sites oriC (cercles rouges) sont à l'opposé du Terminus de répllication (triangles noirs) où se termine la répllication. Les molécules de FtsZ sont représentées par des cercles verts. En présence de SlmA (en bleu), l'anneau Z de division ne peut pas se former par-dessus l'ADN jusqu'à la répllication de la région autour du Terminus, parce que SlmA ne se fixe pas dans cette région. La formation de la machinerie de division cellulaire est donc coordonnée avec la ségrégation de l'ADN.

1.2 Structure des chromosomes bactériens

1.2.1 Compaction du nucléotide bactérien

Chez les eucaryotes, l'ordre de ségrégation des chromatides soeurs était déjà très bien décrit depuis 1880 [Baker 1955]. Mais par manque de techniques appropriées, ce

n'est que dans les années 1930 que des chercheurs ont pu montrer que le chromosome bactérien n'occupait qu'en partie la cellule bactérienne, ce qui laissait déjà penser qu'il y avait une certaine organisation dans le chromosome bactérien. Ces images ont changé la vision du chromosome bactérien, qui est passée de totalement désorganisée à une structure définie qui indiquait l'existence d'une organisation ordonnée et peut être avec un comportement prévisible. Ces formes de nuages observées ont été appelées nucléoides.

Au début des années 1970, une série d'études du chromosome circulaire d'*Escherichia coli* ont permis de montrer une même structure en forme de goupillon via différentes méthodes : en 1972, Worcel et Burgi ont observé des nucléoides isolés d'*Escherichia coli*, et ont trouvé que cet ADN est compacté par des boucles enroulées sur elles mêmes [Worcel & Burgi 1972]. Mais que contrairement aux plasmides dont le super enroulement peut être relâché grâce à une seule coupure, cet ADN issu des nucléoides devait être coupé en plusieurs endroits avant d'être entièrement démêlé, et surtout que couper dans une boucle permettait de la dérouler mais que cela n'affectait pas le reste du chromosome. Le résultat de cette étude a donc été qu'il existe des domaines dans le chromosome qui ne sont pas liés topologiquement entre eux. Pettijohn et Hecht ont par la suite montré en 1974 en lysant doucement la membrane d'*E. coli*, que le chromosome avait une structure stable observée au microscope électronique, avec des boucles enroulées sur elles mêmes partant d'un coeur (voir Figure 1.6, p.15). Ils suggèrent dans la même étude que ce coeur est stabilisé par de l'ARN et des protéines. De nombreuses études viennent corroborer l'existence d'une structure en goupillon ([Kavenoff & Ryder 1976], [Delius & Worcel 1974]). Encore à ce jour, l'existence même de ce coeur, sa composition, sa fonction et son organisation restent des sujets d'intérêt à approfondir.

1.2.1.1 Le super-enroulement négatif

Les facteurs impliqués dans la structuration du nucléoïde semblent variés. Le principal mécanisme de compaction semble être le super-enroulement négatif. En tournant des boucles sur elles-mêmes, les super-enroulements condensent le chromosome sur lui-même mais aussi le séparent d'ADN adjacent (comme les chromatides soeurs ou les plasmides). De plus, en maintenant des régions adjacentes du chromosome proches dans l'espace, on pense que les super-enroulements facilitent ainsi la réparation des cassures doubles-brins en maintenant les extrémités proches. Comme on suppose que ces domaines topologiques d'environ 10 kb sont indépendants [Postow *et al.* 2004], ils protègent le chromosome d'une entière relaxation, ce qui a été prouvé comme étant létal ([Gellert *et al.* 1976], [Gellert *et al.* 1977]). Plusieurs facteurs semblent jouer un rôle dans la formation des super-enroulements et des domaines topologiques. Les topoisomérases sont chargées de décaténer l'ADN emmêlé et contrôler la super-hélicité de segments individuels d'ADN. Ceci leur permet de contrôler le nombre de noeuds et d'enchevêtrements dans l'ADN chromosomique ce qui est un régulateur déterminant de la taille des domaines topologiques [Staczek & Higgins 1998]. En effet, l'ADN gyrase introduit des super-enroulements

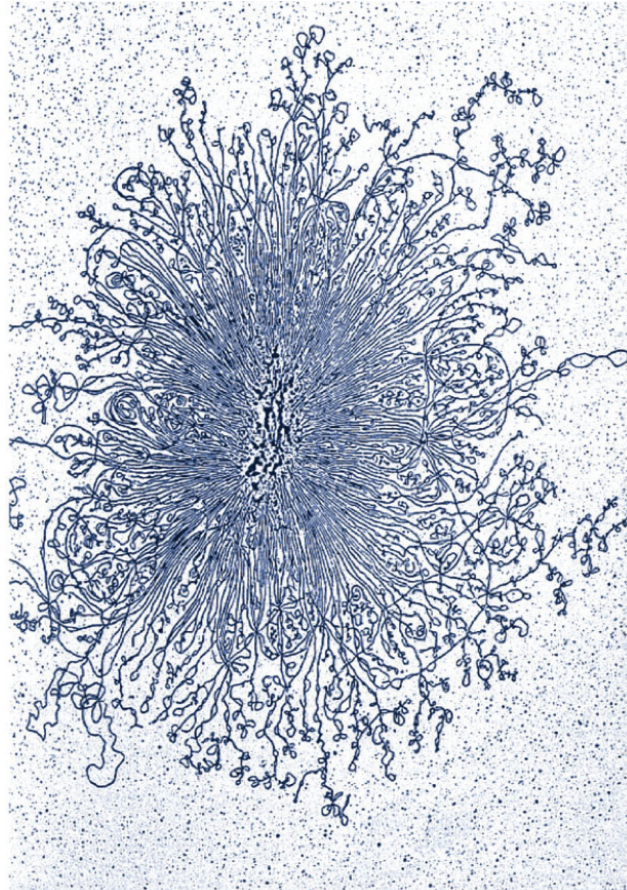


FIGURE 1.6 – Un nucléoïde d'*Escherichia coli* isolé, fixé par le cytochrome C, étalé sur une grille de microscope électronique, marqué à l'uranyl acetate et visualisé par microscopie à transmission électronique. De Kavenoff, 1976

negatifs, alors que la topoisomérase IV les relâche. Leurs actions antagonistes permettent de réguler les super-enroulements dans le chromosome. De plus l'ADN gyrase et la topoisomérase IV (Topo IV) se fixent principalement sur l'ADN juste avant le passage de l'oeil de réplication (ou de transcription) et relâchent les super-enroulements positifs causés par le changement de conformation de l'oeil (voir figure 1.7, p.16) [Staczek & Higgins 1998], cela a été prouvé en cherchant des mutants provoquant une augmentation des super-enroulements positifs ; des mutants TS (sensibles aux hautes températures) de l'ADN gyrase et de TopoIV avaient deux fois plus de barrières topologiques sur le chromosome comparés à des souches sauvages. Les super-enroulements positifs doivent être relâchés car si ils se maintiennent ils peuvent diffuser à l'ADN synthétisé après le passage de l'ADN polymérase et provoquer des enchevêtrements entre les chromatides soeurs, appelés pré-caténanes. Pire, ils peuvent arrêter la fourche de réplication, car ils peuvent empêcher l'ouverture de l'ADN avant le passage de l'ADN polymérase. TopoIV est donc l'un des facteurs les plus importants pour la ségrégation des chromosomes soeurs.

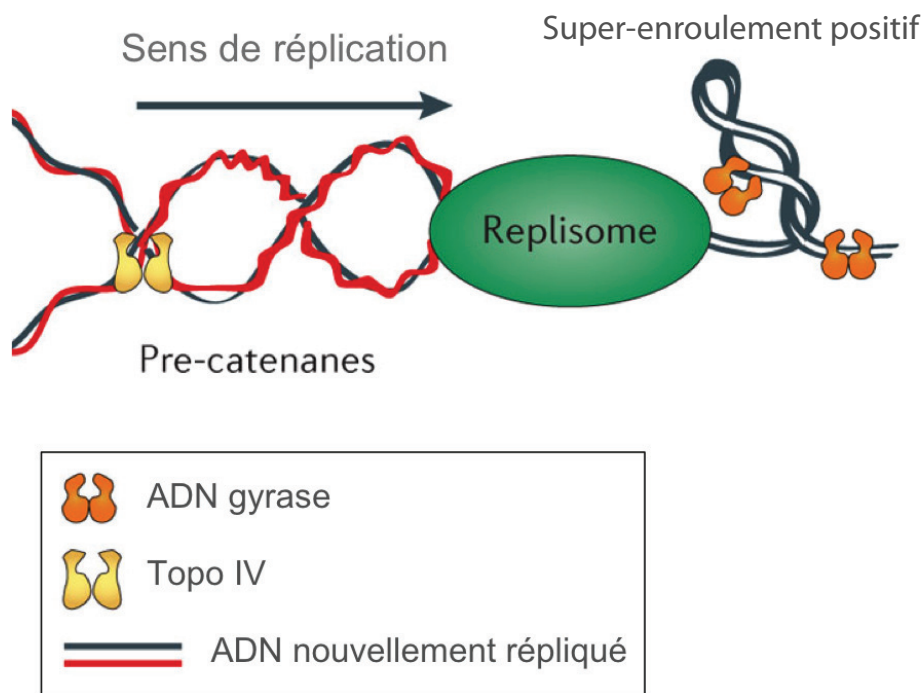


FIGURE 1.7 – Les super-enroulements positifs créés par la progression du complexe de réplication sont enlevés par l'ADN gyrase et la Topoisomérase IV, et les pré-caténanes sont déliées par TopoIV. Tiré de [Wang *et al.* 2013]

La transcription est aussi un facteur important de la régulation de la topologie du nucléotide : en effet, le complexe autour de l'ARN polymérase est trop grand pour suivre les tours de l'hélice d'ADN. Son mouvement étire le brin ma-

trice et génère donc des super-enroulements positifs et négatifs, en amont et en aval de l'oeil de transcription respectivement [Moulin *et al.* 2005], [Wu *et al.* 1988], [Rahmoun & Wells 1992]. De cette manière, la transcription peut former de fortes barrières topologiques, surtout si elle est induite par un fort promoteur.

1.2.1.2 Les protéines NAP "Nucleoid Associated Proteins"

Les super-enroulements ne peuvent pas expliquer seuls la compaction du chromosome et il est estimé qu'environ la moitié du chromosome est compacté par de nombreuses protéines. Certaines sont l'équivalent bactérien de protéines eucaryotes et pour cette raison sont appelées "Histone-like" ou encore NAPs (pour Nucleoid-Associated Proteins) [Dame 2005]. Elles sont caractérisées par un petit poids moléculaire et une grande abondance dans la cellule et ont été découvertes en lysant des cellules afin d'isoler le nucléoïde dans des conditions de stabilisation permettant de conserver et déterminer le contenu protéique du nucléoïde [Varshavsky *et al.* 1977], [Murphy & Zimmerman 1997]. Cependant, au lieu d'enrouler de l'ADN pour former des nucléosomes comme les histones chez les eucaryotes, elles se fixent de façon spécifique et non-spécifique sur l'ADN et contribuent à sa compaction en créant des plis et coudes ou en créant des liaisons entre différents loci et ainsi faciliter la stabilisation de boucles d'ADN. Cette activité laisse à penser que ces protéines pourraient former et maintenir les domaines topologiques. Chez *Escherichia coli*, ces protéines sont HU (Heat-Unstable protein), IHF (Integration Host Factor), Fis (Factor for inversion stimulation) et H-NS (Heat-stable Nucleoid-Structuring protein) (voir figure 1.8, p.18). D'autres espèces telles que *Bacillus subtilis* et *Caulobacter crescentus* possèdent une sous-classe de ces protéines.

Fis ou "Factor for Inversion Stimulation" Fis est la plus abondante de ces protéines dans des cellules en phase de croissance exponentielle, mais sa concentration diminue fortement au début de la phase stationnaire [Azam *et al.* 1999]. Il semble avoir une préférence pour un motif d'ADN assez peu conservé (l'affinité de Fis pour ce motif dépend de la flexibilité du motif et des séquences autour [Bailly *et al.* 1995],[Pan *et al.* 1996]). La fixation de Fis plie l'ADN d'un angle allant de 50 à 90°, ce qui provoque l'extrusion de branches dans un substrat super-enroulé [Schneider *et al.* 2001]. Cette activité peut jouer un rôle important dans la structuration et la dynamique du nucléoïde. De plus, Fis semble avoir une activité de régulateur d'expression de certains gènes et de recombinaison spécifique de site [Bosch *et al.* 1990] [Schneider *et al.* 1999] [Hirvonen *et al.* 2001] [Kelly *et al.* 2004]. Cette protéine semble agir en modulant le super-enroulement local de certaines régions promotrices afin de maintenir des conditions favorables à la transcription. Ainsi, Fis, via son activité permettant de couder l'ADN, maintiendrait des promoteurs de gènes aux apex des branches du nucléoïde formées par le super-enroulement, afin de les exposer au mieux à la machinerie de transcription [Muskhelishvili & Travers 2003].

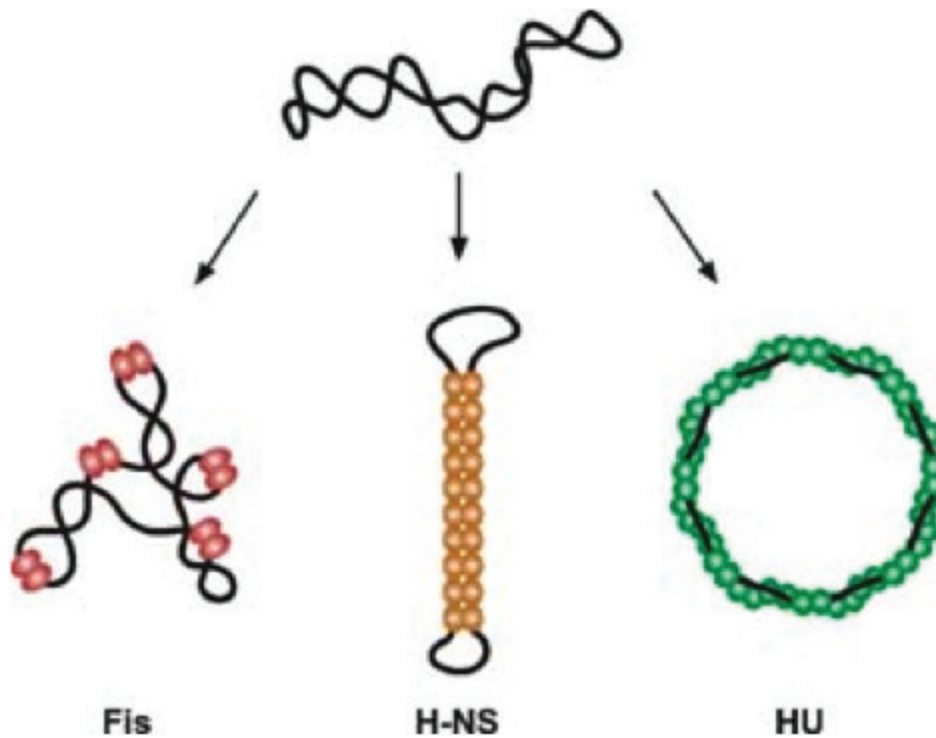


FIGURE 1.8 – Les effets de protéines NAPs sur la conformation d'un plasmide super-enroulé : La fixation de Fis provoque l'extrusion de branches dans de l'ADN super-enroulé ; à de fortes concentrations, H-NS s'assemble en oligomères qui interagissent entre eux et convertissent des plasmides super-enroulés en des structures en forme d'haltères ; à de fortes concentrations, HU s'assemble avec l'ADN en filaments nucléoprotéiques rigides, ce qui ouvre l'ADN superenroulé dans une conformation en anneau. Tiré de [Thanbichler *et al.* 2005]

IHF ou "Integration Host Factor" IHF a d'abord été découverte car cette protéine stimule plusieurs systèmes de recombinaison spécifique de site. Son séquençage a permis de déterminer par la suite qu'elle partage de grandes homologies avec HU. IHF se fixe à des motifs très précis [Engelhorn *et al.* 1995] et plie l'ADN d'un angle d'environ 160° [Rice *et al.* 1996], ce qui jouerait un rôle dans la compaction du nucléoïde. Une étude de molécule-unique a montré que la fixation d'IHF de façon non-spécifique pouvait condenser un ADN linéaire en une structure enroulée de façon aléatoire [Ali *et al.* 2001]. De la même façon que Fis, IHF forme des boucles d'ADN et semble être un régulateur de la transcription, en permettant l'interaction entre l'ARN polymérase et des protéines régulatrices distantes [Goosen & van de Putte 1995], [Seong *et al.* 2002]. De la même façon, IHF facilite la formation de complexes d'initiation aux origines de réplication plasmidiques et bactériennes [Filutowicz & Inman 1995], [Cassler *et al.* 1995].

H-NS ou "Heat-stable Nucleoid-Structuring protein" H-NS semble interagir avec l'ADN de façon aspécifique du point de vue de la séquence, mais semble préférer un ADN incurvé pour se fixer [Dame *et al.* 2001]. Cette protéine semble être un régulateur d'expression de plus de 200 gènes chez *E.coli*, mais son mécanisme d'action n'est pas encore compris [Hommais *et al.* 2001]. Néanmoins, sa capacité à s'oligomériser [Rimsky *et al.* 2001] et à condenser l'ADN dans des complexes nucléo-protéiques lui permet de jouer un rôle de facteur de transcription, en bloquant des régions promotrices et la transcription [Schroder & Wagner 2000], [Dame *et al.* 2002]. H-NS se fixe à différents endroits sur l'ADN et ces îlots interagissent entre eux, formant des liaisons entre différentes régions normalement distantes [Dame *et al.* 2000]. Une oligomérisation a lieu, ce qui forme des filaments d'ADN entourés d'H-NS. Cette action de compaction est confirmée par une étude montrant que la sur-expression de H-NS entraîne une condensation anormale du nucléoïde [Spurio *et al.* 1992]. Une étude récente a montré que la protéine H-NS pourrait jouer un rôle dans la structuration du chromosome d'*E.coli* [Wang *et al.* 2011], en regroupant en cluster les gènes qu'elle régule. Ces observations ont été faites par microscopie de fluorescence à très haute résolution et par une capture de conformation des chromosomes (voir "Techniques d'Études" plus loin). De façon intéressante, ces cluster se forment près du coeur du nucléoïde, mais leur fonction et leur influence sur les macrodomaines ne sont pas encore connues.

HU ou "Heat-Unstable protein" L'activité de condensation de H-NS est contre-balançée par HU [Dame & Goosen 2002], qui interagit également avec l'ADN de façon non séquence-spécifique, mais avec une préférence pour les coupures ou les structures en cruciforme [Kasmashev *et al.* 1999]. À de basses concentrations dans la cellule, HU compacte l'ADN de façon modérée, en pliant l'ADN [Sagi *et al.* 2004], [Swinger *et al.* 2003]. Néanmoins, à de plus hautes concentrations cellulaires, HU polymérise et semble former des filaments rigides sans incidence sur la condensation [Sagi *et al.* 2004], [Skoko *et al.* 2004]. Son action anta-

goniste avec H-NS est confirmée par l'observation que la fixation de HU relaxe l'ADN plasmidique super-enroulé, tandis que H-NS condense l'ADN circulaire. De plus, la répression de la transcription induite par H-NS est augmentée chez les mutants ne possédant pas HU, mais diminuée chez les mutants où HU est surexprimée [Delihas & Forst 2001], [Manna & Gowrishankar 1994]. La concentration cellulaire de HU étant modulée en fonction de la phase de croissance de la bactérie [Azam *et al.* 1999], [Claret & Rouviere-Yaniv 1997], HU pourrait moduler la structuration du nucléoïde et ainsi l'expression génétique en fonction de l'état physiologique de la cellule.

Les mutants ne possédant pas ces protéines "Histone-like" ont un défaut de ségrégation du chromosome, mais le nucléoïde ne semble pas complètement décondensé en leur absence, ce qui laisse penser que d'autres facteurs plus importants entrent en jeu dans la compaction du nucléoïde.

1.2.1.3 Le complexe SMC, Structural Maintenance of Chromosomes

Le complexe SMC, qui est quasi universel, est probablement le meilleur candidat pour compacter des super-enroulements et structurer le nucléoïde [Hirano 2006]. Chez les eucaryotes, les complexes SMC agissent sur la condensation des chromosomes et la cohésion des chromatides soeurs [Nasmyth & Haering 2005]. Chez les bactéries, le complexe SMC est composé de longs polypeptides, caractérisés par des domaines N- et C-terminaux conservés, qui possèdent un motif de fixation à l'ADN de type Walker A et B respectivement. La partie centrale consiste en deux motifs en hélice séparés par un linker. Ces motifs se replient l'un sur l'autre de façon antiparallèle, ce qui permet aux deux domaines terminaux de s'assembler pour former un domaine fonctionnel de fixation de l'ATP [Melby *et al.* 1998], [Hirano & Hirano 2002]. Les régions linker de deux monomères vont ensuite interagir pour former un complexe en "V" d'un angle de 0 à 180° [Melby *et al.* 1998], [Hirano *et al.* 2001]. La même conformation a été observée pour le complexe MukBEF chez *E. coli* [Niki *et al.* 1991], [Melby *et al.* 1998] (voir figure 1.9, p.21). De nombreuses études ont montré que les complexes SMC et MukBEF peuvent former des liaisons entre des boucles d'ADN *in vitro*, cela a été montré grâce à des techniques de pince-magnétique [Cui *et al.* 2008], [Petrushenko *et al.* 2010]. Une étude en microscopie de fluorescence à haute-résolution a montré que les complexes MukBEF agissent sous forme de dimères [Badrinarayanan *et al.* 2012]. De plus, des mutants *E. coli* ne possédant plus ces systèmes ne survivent pas à 37°C. Les cellules parviennent à survivre à de plus basses températures, mais ont des défauts de ségrégation du chromosome et un nucléoïde décondensé [Britton *et al.* 1998], [Mascarenhas *et al.* 2002], [Jensen & Shapiro 1999]. De façon intéressante, lorsque SMC et MukBEF sont marqués avec des protéines fluorescentes, les deux complexes forment des foci fréquemment associés au réplisome ou aux pôles cellulaires [Graumann *et al.* 1998], [Ohsumi *et al.* 2001], [Lindow *et al.* 2002], [Jensen & Shapiro 2003], [Danilova *et al.* 2007]. Ces indices laissent à penser qu'ils pourraient agir à un stade précoce de la compaction de l'ADN, peut être afin de

faciliter sa condensation par d'autres systèmes par la suite.

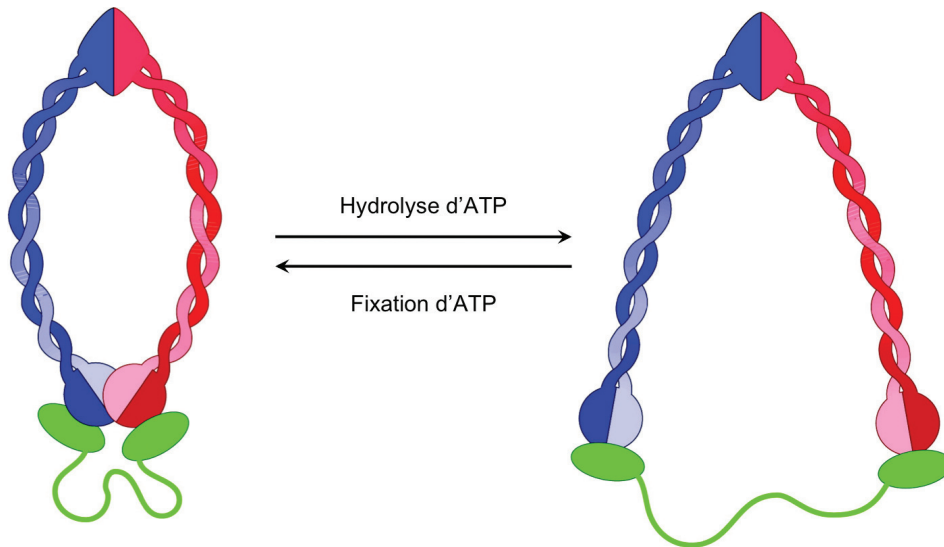


FIGURE 1.9 – Structure des SMC : ils sont composés de longs polypeptides, qui sont caractérisés par des domaines N- et C-terminaux conservés, qui possèdent un motif de fixation à l'ADN. La partie centrale consiste en deux motifs en hélice séparés par un linker. Ces motifs se replient l'un sur l'autre de façon antiparallèle, ce qui permet aux deux domaines terminaux de s'assembler pour former un domaine fonctionnel de fixation de l'ATP. Les régions linker de deux monomères (représentés en bleu et rouge) vont ensuite interagir pour former un complexe en "V" relié par la protéine associée Scc1 α -kleisine (en vert). Tiré de [Nasmyth & Haering 2005]

1.2.2 Les macrodomaines

Les chromosomes sont organisés à un niveau plus élevé en macrodomaines : des études d'abord chez *Salmonella typhimurium* [Garcia-Russell *et al.* 2004] puis plus en détails chez *Escherichia coli* [Valens *et al.* 2004] suggèrent que le mouvement de l'ADN dans le cytoplasme de la cellule est contraint. Une analyse de recombinaisons spécifiques de site entre des sites de recombinaison de l'intégrase λ a montré que l'interaction entre deux sites n'est possible qu'au sein de régions définies du chromosome, ce qui a permis de définir 4 macrodomaines chez *E. coli* d'une taille entre 800kb et 1Mb chaque : l'Ori autour de l'origine de réplication, le domaine Ter autour du terminus de réplication et les macrodomaines Left et Right de chaque côté du Ter. Deux autres régions flexibles, ou non-structurées (qui interagissent avec le reste du chromosome) ont été définies également de chaque côté de l'Ori [Valens *et al.* 2004] (voir figure 1.10, p.22).

Des analyses par microscopie de fluorescence (voir section suivante) ont permis de montrer que différents loci dans un même macrodomaine sont toujours colocalisés, et surtout que des loci situés dans des macrodomaines ont un mouvement

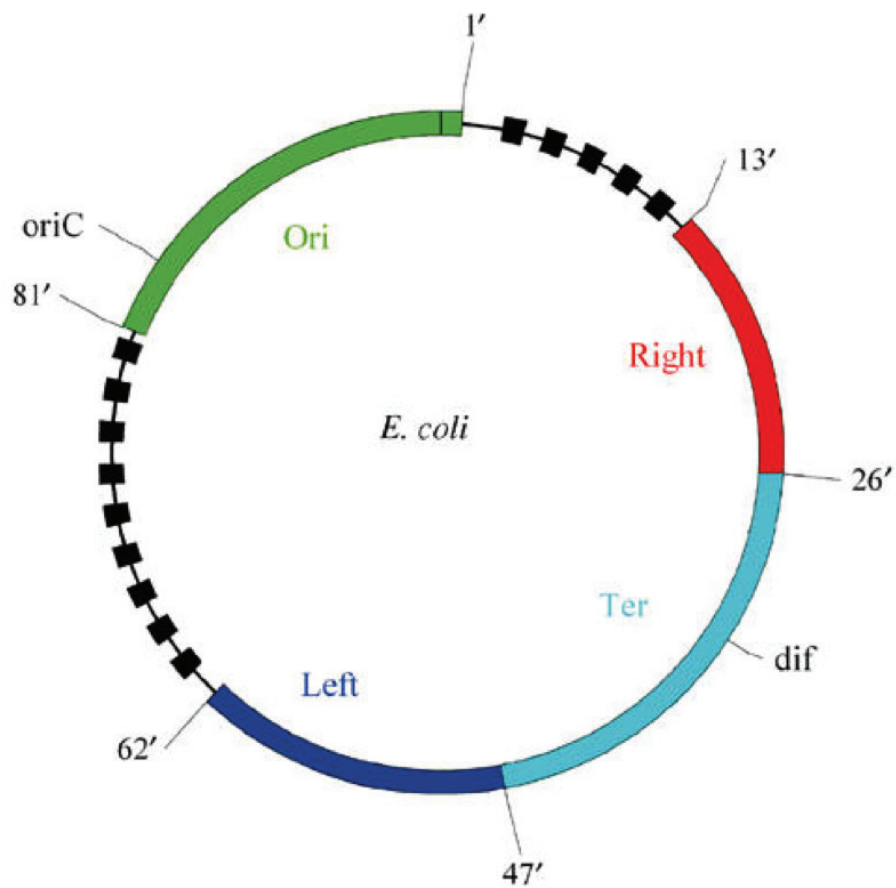


FIGURE 1.10 – Représentation graphique des macrodomaines d'*E. coli* (en couleur) et des régions non-structurées (en noir) sur la carte du chromosome. Tiré de [Valens *et al.* 2004]

restreint dans la cellule par rapport à des loci situés dans les domaines non-structurés [Éspeli *et al.* 2008]. Les mécanismes d'organisation de ces macrodomaines restent à étudier, mais des études semblent pointer vers des protéines les organisant : grâce à une analyse bioinformatique, Mercier *et al.* ont identifié une séquence présente uniquement dans le macrodomaine Ter. La séquence *matS* (pour "Macrodomain Ter Sequence") est un palindrome de 13 bp présent à 23 reprises dans le macrodomaine Ter, sur laquelle la protéine MatP (pour "Macrodomain Ter Protein") se fixe [Mercier *et al.* 2008]. Dans les mutants ne possédant plus cette protéine, le macrodomaine Ter est décondensé, interagit avec d'autres macrodomaines, et a une mobilité comparable à celle d'un domaine non-structuré, ce qui indique une désorganisation du Ter. De plus, sans MatP, lors de la réplication, les deux domaines Ter répliqués ne restent plus colocalisés jusqu'à la division, mais se séparent beaucoup plus tôt, ce qui montre que la ségrégation des chromosomes lors de la réplication est finement régulée. Dans des cellules $\Delta MatP$, un défaut de ségrégation des chromosomes est observé via l'apparition de cellules filamenteuses et de cellules anucléées en milieu riche. En revanche, aucun défaut n'est observé en milieu minimum, ce qui montre la capacité des bactéries à adapter leur physiologie en fonction des conditions de culture. Le système MatP-*matS* est conservé dans les génomes des entérobactéries, des *Vibrios* et des *Pasteurella* [Mercier *et al.* 2008], et leur position autour du Ter de réplication est conservée dans ces espèces. La protéine MatP semble être bien conservée car les structures observées pour le MatP d'*E. coli* et de *Yersinia pestis* sont les mêmes [Dupaigne *et al.* 2012]. Son domaine N-terminal est un regroupement de 4 hélices, connecté à une partie centrale en feuillet β -hélice-hélice, et la partie C-terminale est une double-hélice qui présente une certaine flexibilité. MatP se fixe aux sites *matS* sous forme de dimère et relie deux sites *matS* distants grâce au contact des parties C-terminales de deux dimères de MatP. Chez *E. coli*, MatP interagit avec la protéine ZapB qui semble l'ancrer au septum de division et retarder la ségrégation des *ter* répliqués jusqu'à la division. Ainsi, le système qui permet d'organiser le *ter* en macrodomaine agit de concert avec des protéines de la machinerie de division, coordonnant la structuration du chromosomes, la ségrégation des chromosomes-soeurs et la division [Éspeli *et al.* 2012]. La ségrégation est en corrélation avec l'organisation en macrodomaines : chez *E. coli*, il a été observé par microscopie de fluorescence que des loci situés dans un macrodomaine ont une ségrégation régulière et progressive, alors que des loci situés dans des domaines Non-Structurés ont un comportement plus erratique. On ne sait pas pour l'instant si les macrodomaines sont conservés dans d'autres organismes, ni quel pourrait être le rôle (à part pour le *ter* où on sait que MatP-*matS* joue un rôle dans la ségrégation) de ces macrodomaines dans des processus cellulaires.

1.3 Différents modèles et mécanismes de ségrégation des chromosomes

N'ont été décrits jusqu'à maintenant que l'organisation et la compaction du chromosome. Le positionnement de l'origine et du terminus dans la cellule a été évoqué, mais le développement de différentes méthodes d'analyse des chromosomes a permis d'observer des organisations très précises et jusque là insoupçonnées. Ces observations, robustes, nous informent sur le positionnement du chromosome dans la cellule et sur la ségrégation de l'ADN nouvellement répliqué.

1.3.1 Différentes techniques d'études

Différentes techniques ont été mises au point afin d'étudier le positionnement de l'ADN dans les bactéries. Ces techniques peuvent être séparées en deux catégories : les techniques d'observation directe au microscope et les techniques d'observation indirectes, *via* l'analyse des interactions entre différentes régions du chromosome.

1.3.1.1 Techniques de microscopie

Fluorescence *In Situ* Hybridization (FISH) La fluorescence par hybridation *in situ* permet d'observer des loci précis du chromosome, grâce à des fragments d'ADN complémentaires aux loci d'intérêt. Ces fragments sont marqués par des fluorophores, ce qui permet une observation par microscopie de fluorescence. Les sondes d'ADN sont introduites dans des cellules fixées et perméabilisées (exemple dans l'étude de Niki *et al.*, 2000) Cette technique permet donc d'observer de façon directe et très précise des loci sur le chromosome, sans avoir à apporter de modifications au génome. Néanmoins, parce qu'elle nécessite de fixer et de perméabiliser les cellules, cette technique ne permet qu'une vision statique du chromosome et les différents traitements de fixation et de perméabilisation peuvent changer la conformation de l'ADN (voir figure 1.11, p.25).

Fluorescence Repressor-Operator System (FROS) Le système de fluorescence répresseur-opérateur permet de visualiser par microscopie des loci précis du chromosome, en introduisant à côté du locus d'intérêt, une répétition de séquences d'ADN (l'opérateur) qui sera reconnue par une protéine (le répresseur) fusionnée à une protéine fluorescente. Les systèmes les plus utilisés sont *lacO*-LacI et *tetO*-TetR [Robinett *et al.* 1996],[Lau *et al.* 2003]. Le système *parS*-ParB, bien que n'étant pas un système répresseur-opérateur, fonctionne de la même façon et n'interagit pas avec les *parS*-ParB bactériens, car les systèmes utilisés pour marquer le chromosome sont d'origine plasmidique [Nielsen *et al.* 2006],[Wang *et al.* 2008]. (voir "ségrégation des origines" plus loin) Cette technique a l'avantage de permettre une visualisation dans des cellules vivantes, et donc un suivi au cours du cycle cellulaire, sur de petites ou de longues périodes. Mais cela nécessite l'insertion de séquences exogènes dans le génome, et la nature même des protéines peut provoquer des artefacts comme de

1.3. Différents modèles et mécanismes de ségrégation des chromosomes

la cohésion et faire penser que certains loci sont colocalisés cela est seulement dû à la protéine utilisée. De plus, la fixation parfois très forte des protéines LacI, TetR et ParB à leurs cibles *lacO*, *tetO* et *parS* peut empêcher la transcription des gènes voisins (voir figure 1.11, p.25).

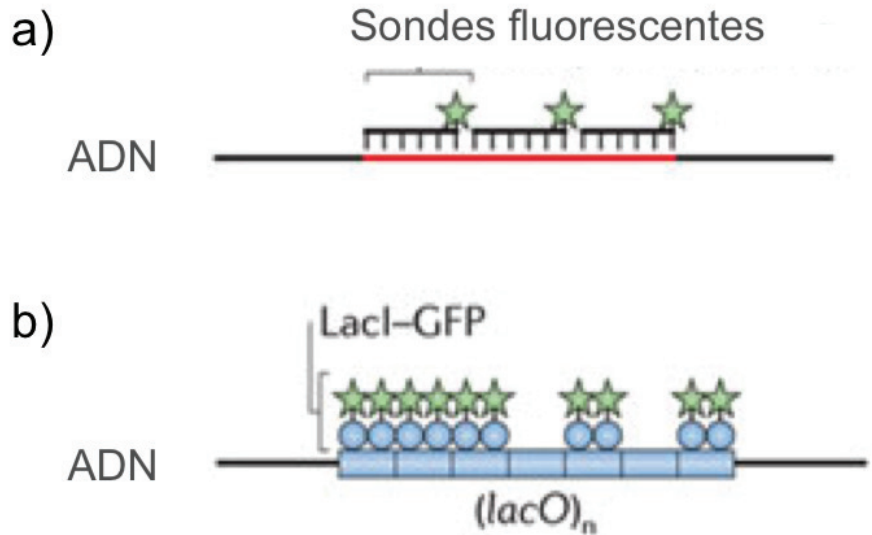


FIGURE 1.11 – Techniques de microscopie : **a)** la Fluorescence par hybridation *in situ* (FISH) qui permet la visualisation de loci dans des cellules fixées en utilisant des sondes d'ADN complémentaires des loci en question, marquées avec des fluorophores. **b)** le système de fluorescence répresseur-opérateur (FROS) qui permet la visualisation de loci dans des cellules vivantes en utilisant des protéines fluorescentes se fixant à des séquences insérées à côté des loci étudiés. Tiré de [Wang *et al.* 2013]

1.3.1.2 Techniques d'analyse génomiques

Méthodes basées sur l'immunoprécipitation de la chromatine (ChIP)

Ces méthodes permettent d'identifier sur le génome entier les sites d'attachement de protéines se fixant à l'ADN. Les complexes ADN-protéine sont fixés et isolés par immunoprécipitation. L'ADN attaché à la protéine est ensuite identifié par hybridation sur un microarray (pour le ChIP-chip) ou par séquençage (pour le ChIP-seq) (exemple dans l'étude de Mercier *et al.*, 2008). Ces techniques permettent donc d'avoir des informations sur le génome entier et d'identifier les interactions ADN-protéine dépendantes de la séquence ou non. Néanmoins, le fait qu'elles soient basées sur une population ne leur permet de fournir qu'une information d'ensemble. De plus, la qualité de la fixation des complexes ADN-protéine et la qualité des anticorps utilisés pour l'immunoprécipitation peut altérer l'efficacité des expériences et produire des faux-positifs (voir figure 1.12, p.27).

Méthodes de Capture de Conformation des Chromosomes (3C, 5C et Hi-C) Ces méthodes permettent d'analyser la conformation globale du chromosome en calculant la fréquence de proximité de deux loci sur l'ADN. Les techniques consistent à fixer les séquences d'ADN proches dans les cellules. La technique originale est la méthode "Chromosome Conformation Capture" (3C) qui permet d'analyser les interactions entre deux régions précises du chromosome. De cette technique dérivent les techniques qui permettent des analyses à grande échelle : 5C (Chromosome Conformation Capture Carbon Copy) et Hi-C [Dekker *et al.* 2002], [Lieberman-Aiden *et al.* 2009], [Umbarger *et al.* 2011]. Ces méthodes ont l'immense avantage de donner des informations sur la conformation en 3 dimensions des génomes bactériens, mais sont techniquement très difficiles à mettre en place. De plus, comme pour les techniques basées sur le ChIP, elles ne donnent des informations que sur l'ensemble d'une population, ce qui peut diluer l'information si il existe plusieurs types de conformation dans une même population (voir figure 1.12, p.27).

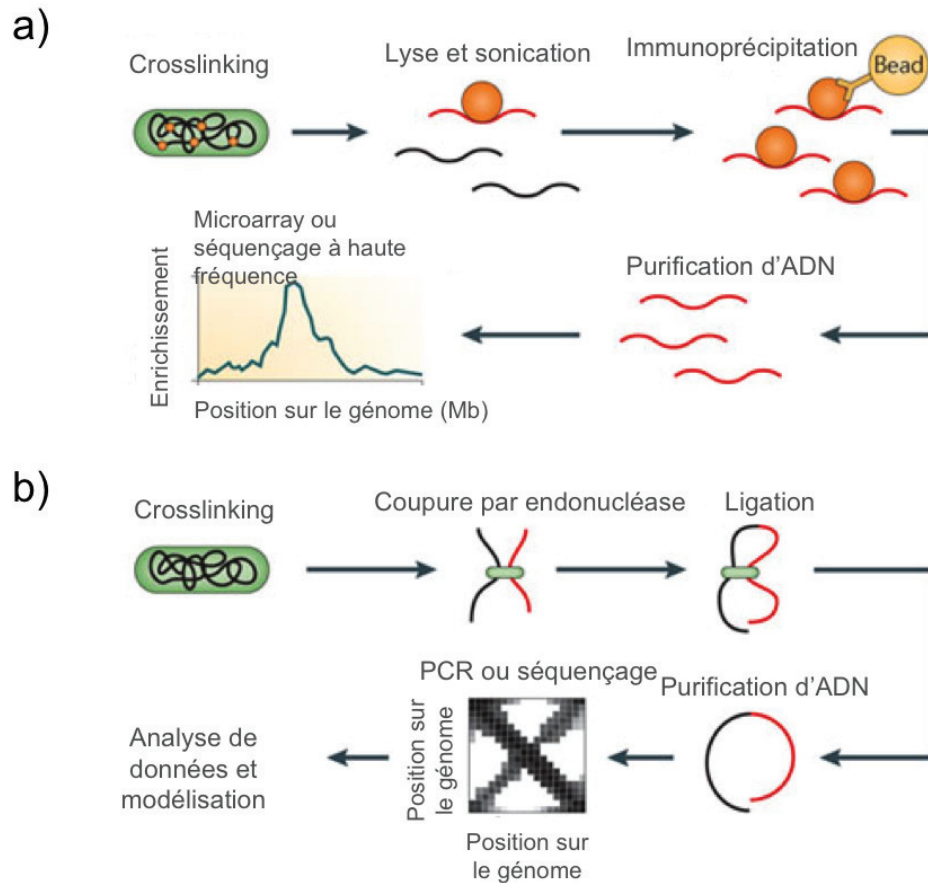


FIGURE 1.12 – Techniques d’analyse sur le génome entier. **a)** Méthodes basées sur l’immunoprécipitation de chromatine (ChIP). Ces méthodes permettent l’identification sur le génome entier de sites de fixations pour les protéines se liant à l’ADN. Les complexes ADN-protéine sont fixés et isolés par immunoprécipitation. L’ADN attaché à la protéine est ensuite identifié par hybridation sur un microarray (pour le ChIP-chip) ou par séquençage (pour le ChIP-seq). **b)** Méthodes de capture de conformation des chromosomes. Ces méthodes permettent d’analyser la conformation globale du chromosome en calculant la fréquence de proximité de deux loci sur l’ADN. Les techniques consistent à fixer les séquences d’ADN proches dans les cellules. Tiré de [Wang *et al.* 2013]

1.3.2 Différents modèles bactériens d'organisation spatiale du chromosome

1.3.2.1 *Bacillus subtilis*

Les premières études cherchant à définir la localisation dans la cellule de loci particuliers ont été faites chez *Bacillus subtilis* [Webb *et al.* 1997], qui possède un chromosome circulaire de 4.2 Mb. En plus de la division symétrique qui lui permet de se multiplier, *B. subtilis* est capable de division asymétrique pour former une endospore, une structure contenant l'information génétique de la bactérie et résistante à des conditions défavorables aux bactéries. La sporulation est souvent vue comme étant une forme simplifiée de différenciation cellulaire, ce qui fait de *B. subtilis* un organisme modèle pour l'étude de ce phénomène. *Bacillus subtilis* étant capable de réplication multiple, les études suivantes ont toutes été menées dans des milieux minimum, afin de n'avoir que des cellules ne contenant qu'une copie du chromosome juste après la division (voir section 1.1.2).

L'analyse du positionnement d'un locus à l'Origine a montré qu'il se trouvait près du centre de la cellule lors de l'initiation de la réplication et qu'une fois répliquées, les origines ségrégeaient très rapidement vers l'extérieur du nucléoïde. L'observation de différentes positions sur le chromosome a mené à la conclusion qu'à la fin de la réplication (juste avant la division) les origines sont aux positions $\frac{1}{4}$ $\frac{3}{4}$ de la cellule (les centres des futures cellules-filles), les termini au centre de la cellule (au septum) et les positions sur les réplichores gauche et droit sont entre les deux [Teleman *et al.* 1998]. Les mécanismes permettant ce mouvement des origines sont encore à définir. Il est intéressant de constater qu'une organisation *Ori-ter-ter-Ori* avec les Ori aux pôles a été observée dans des cellules en sporulation de *B. subtilis* grâce à une étude génétique [Wu & Errington 1998] (voir figure 1.13, p.29). Des études similaires, chez *Caulobacter crescentus* et *Escherichia coli* ont rapidement suivi ces découvertes, grâce notamment à l'évolution des techniques.

1.3.2.2 *Caulobacter crescentus*

Caulobacter crescentus est une bactérie Gram-négative que l'on trouve principalement dans les cours d'eau. Elle tient son nom de sa forme en croissant ("crescent" en anglais), elle possède un chromosome circulaire de 4 Mb et est pourvue d'un seul flagelle situé à un pôle. Lorsque la bactérie amorce la réplication du chromosome afin de mener à bien sa multiplication, le flagelle tombe et à la place pousse un pied, qui permet à la bactérie de se fixer à un support. À la fin de la réplication, les deux cellules filles sont très différentes : l'une est mobile et possède un flagelle, alors que l'autre a un pied et reste fixée. De part son cycle cellulaire très particulier, *C. crescentus* est un organisme modèle pour étudier le cycle cellulaire, la différenciation cellulaire ainsi que la division asymétrique. De plus, il n'y a que un cycle de réplication du chromosome par cycle cellulaire : toutes les cellules après division n'ont qu'un chromosome quelque soit le milieu. L'analyse d'environ 100 loci différents son chromosome circulaire a permis de montrer que comme pour *B. subtilis*,

1.3. Différents modèles et mécanismes de ségrégation des chromosomes 29

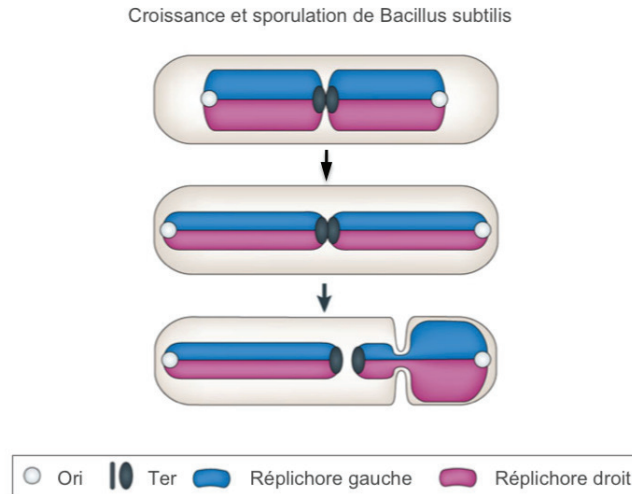


FIGURE 1.13 – Chorégraphie de ségrégation du chromosome circulaire de *Bacillus subtilis*, en sporulation en milieu minimum. La sporulation permet d’emprisonner dans une spore l’ensemble du matériel génétique (dernière étape de ségrégation non représentée). Figure tirée de [Wang *et al.* 2013]

la position des loci dans la cellule est corrélée à leur position sur la carte génétique [Viollier *et al.* 2004]. En effet, l’Origine est à un pôle, le Terminus au pôle opposé et les positions sur les réplichores gauche et droit entre les deux, de façon linéaire, c’est à dire que plus une position est proche de l’origine sur la carte du chromosome, plus elle sera proche du pôle où se trouve l’Origine.

Contrairement au chromosome de *B. Subtilis*, l’initiation de la réplication du chromosome de *C. crescentus* ne se fait pas au centre de la cellule mais au pôle. Par la suite, une des origines répliquées restera au pôle alors que l’autre migrera très rapidement au pôle opposé, entraînant le reste du chromosome répliqué. Ainsi à la fin de la réplication, on retrouve une organisation des chromosomes soeurs en *Ori-ter-ter-Ori*. Avec cette étude il n’est pas possible de déterminer si les réplichores gauches et droit sont alignés face à face ou si ils sont emmêlés. Une autre étude a permis de répondre à cette question : grâce à la méthode de Capture des Conformation du Chromosome 5C appliquée sur une population de cellules synchronisées au stade pré-réplcatif, il a été possible d’étudier les interactions entre les deux réplichores du chromosome de *C. crescentus*, et de modéliser pour la première fois un chromosome bactérien en 3D [Umbarger *et al.* 2011]. Cette étude a permis de montrer que les deux réplichores, comme observé dans les études de microscopie de fluorescence, sont alignés sur un axe ori-ter et sont symétriques. De plus, il a été montré que les réplichores sont spatialement séparés, mais s’enroulent l’un autour de l’autre : *C. crescentus* condense donc ses deux réplichores séparément, en deux "goupillons" (voir figure 1.14, p.30). Cette forme de nucléoïde enroulé a également été observée grâce à d’autres techniques moins précises chez *B. subtilis* [Berlitzky *et al.* 2008] et

E. coli [Yazdi *et al.* 2012].

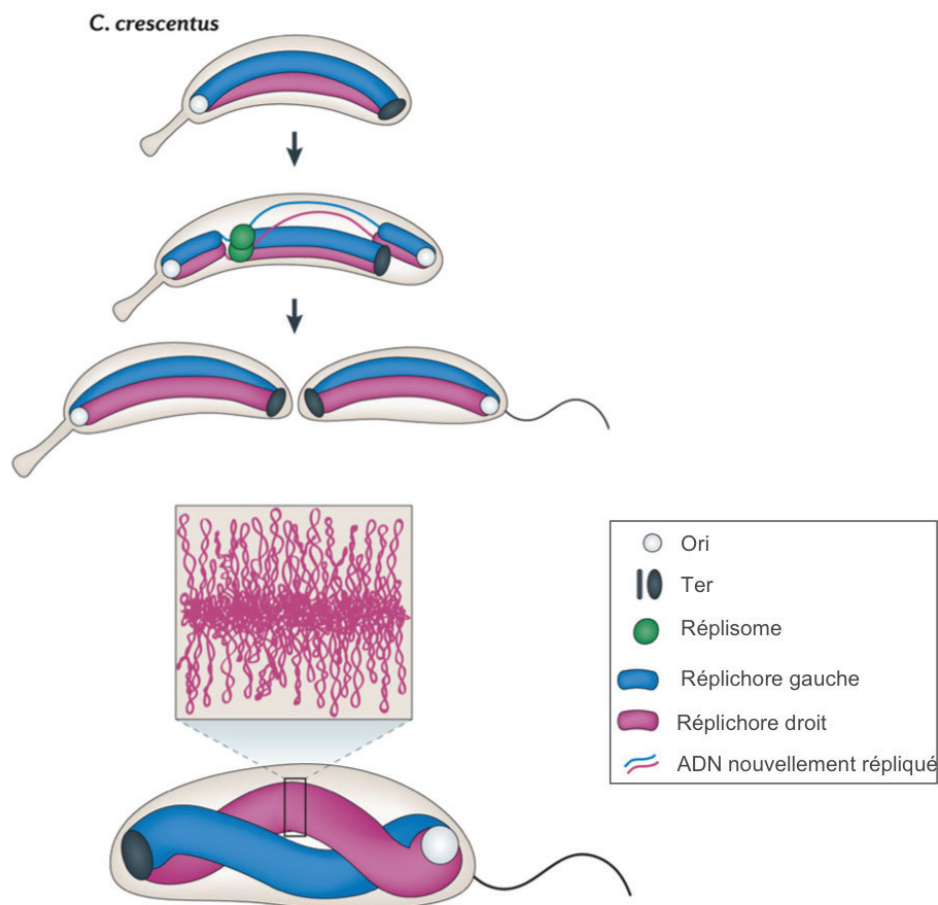


FIGURE 1.14 – Chorégraphie de ségrégation du chromosome circulaire de *Caulobacter crescentus*. Tiré de [Wang *et al.* 2013]

1.3.2.3 *Pseudomonas aeruginosa*

Les membres du genus *Pseudomonas* (des γ -proteobactéries) montrent une diversité et une versatilité remarquable, à la fois métabolique et physiologique, ce qui leur permet de coloniser différents habitats terrestres et aquatiques. L'une d'elles, *Pseudomonas aeruginosa* est une bactérie capable de vivre dans un milieu aquatique et qu'on trouve également dans le sol, et elle est également capable d'infecter beaucoup d'organismes, des plantes aux mammifères en passant par les invertébrés. Chez les Humains, *P. aeruginosa* est un pathogène opportuniste qui cause des infections sérieuses chez les patients immunodéprimés, jusqu'à être la principale cause de décès chez les patients atteints de fibrose kystique. Ces infections sont particulièrement difficiles à traiter, car la bactérie a une résistance aux antibiotiques très large. *P.*

1.3. Différents modèles et mécanismes de ségrégation des chromosomes

aeruginosa possède un unique chromosome circulaire de 6.3 Mb. Comme pour *C. crescentus*, ce chromosome est organisé de façon longitudinale avec l'ori vers un pôle et le ter au pôle opposé. Il semble que des loci proches de l'origine de réplication colocalisent ensemble, ce qui est une indication qu'un macrodomaine peut exister sur le chromosome. On observe la même chose autour de *dif*, le site autour duquel la réplication se termine : des loci autour de *dif* marqués par des fluorophores sont colocalisés. Il semble donc y avoir deux macrodomaines chez *P. aeruginosa*, ce qui n'avait jamais été montré ailleurs que chez *E. coli* [Valens *et al.* 2004]. De plus, alors que chez *E. coli* le macrodomaine Ter est organisé par la protéine MatP qui se fixe à des sites *matS* que l'on ne trouve que dans ce macrodomaine, aucun homologue de MatP n'a été trouvé chez *P. aeruginosa*, et aucune séquence spécifique au macrodomaine putatif n'a été trouvée non plus. Un autre mécanisme d'organisation des macrodomaines doit donc entrer en jeu. Pendant la réplication, le complexe de réplication est au centre de la cellule et les régions du chromosome migrent de façon séquentielle au centre de la cellule puis chaque locus répliqué migre à sa future position dans les cellules-filles [Vallet-Gely & Boccard 2013] (voir figure 1.15, p.31).

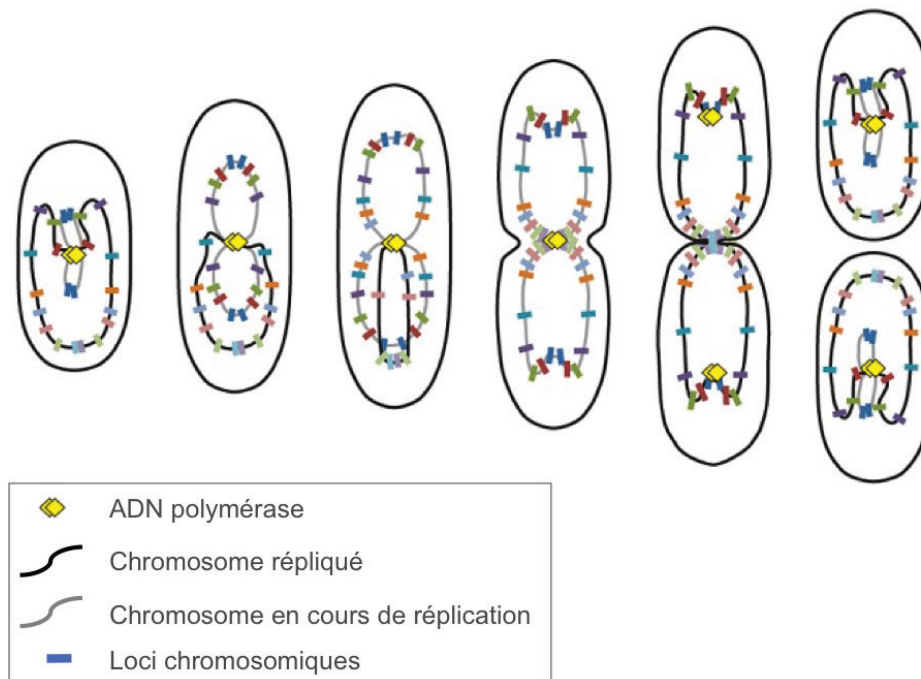


FIGURE 1.15 – Chorégraphie de ségrégation du chromosome circulaire de *Pseudomonas aeruginosa*, en milieu minimum. Tiré de [Vallet-Gely & Boccard 2013]

1.3.2.4 *Escherichia coli*

Les mêmes études systématiques ont été menées chez *Escherichia coli*, modèle bactérien par excellence. *E. coli* est une bactérie Gram-négative que l'on trouve un peu partout, mais elle a été découverte dans la flore commensale de l'intestin humain. Comme elle était une des premières bactéries découvertes et cultivables en laboratoire, la plupart des techniques et outils en microbiologie et biotechnologie ont été développées pour cette bactérie, notamment pour la recombinaison d'ADN. Tout comme *B. subtilis* en milieu riche, *E. coli* peut initier des cycles de réplication multiples de son chromosome. En cultivant *E. coli* dans un milieu minimum, on obtient donc des cellules après division ne possédant qu'un chromosome. *E. coli* possède un chromosome circulaire d'environ 4.6 Mb dont le positionnement est radicalement différent de celui du chromosome de *C. caulobacter*. Juste après la division, l'origine du chromosome est au centre de la cellule avec les réplichores gauche et droit séparés de chaque côté, et le terminus, condensé par le système MatP-matS, est au centre de la cellule [Nielsen *et al.* 2006], [Wang *et al.* 2006] [Éspeli *et al.* 2008]. Après réplication, les cellules-filles ont donc une organisation *left-Ori-right*, *left-Ori-right*. Malgré un positionnement différent des deux précédents chromosomes décrits, on observe chez *E. coli* une organisation dans la cellule en corrélation avec la carte du chromosome : les deux réplichores sont organisés de façon linéaire, c'est à dire que plus un locus sera proche de l'Origine sur la carte du chromosome, plus il sera proche du centre de la cellule (voir figure 1.16, p.32).

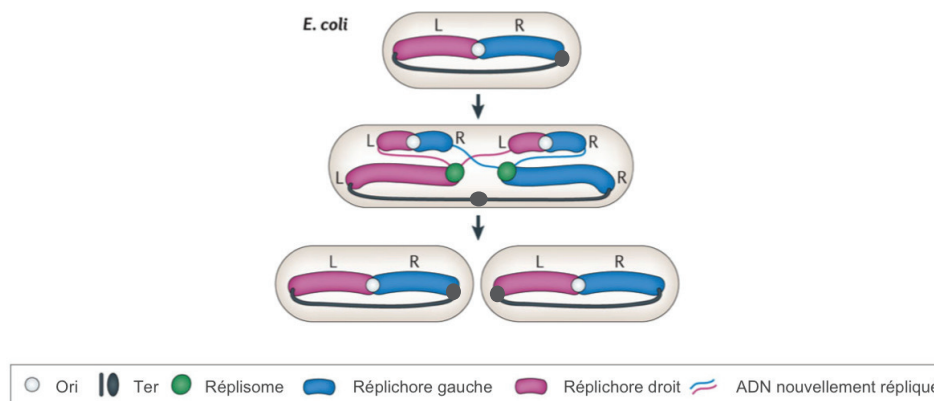


FIGURE 1.16 – Chorégraphie de ségrégation du chromosome circulaire de *Escherichia coli*, en milieu minimum. Tiré de [Vallet-Gely & Boccard 2013]

1.3.3 Les mécanismes de ségrégation des chromosomes

Les études évoquées ont donc révélé une grande organisation du chromosome, qui est à la fois à l'origine et le résultat de la réplication et de la ségrégation des chromosomes-soeurs, qui dans les bactéries se font en même temps. Il est donc impor-

1.3. Différents modèles et mécanismes de ségrégation des chromosomes 88

tant afin de mieux comprendre l'organisation et le positionnement du chromosome, de mieux connaître les différentes étapes de la ségrégation des chromatides-soeurs. La ségrégation de la plupart des chromosomes bactériens peut être divisée en 3 étapes : la séparation des origines nouvellement répliquées, la ségrégation du reste du chromosome et enfin la résolution des dimères et le transport des termini au septum de division. De façon surprenante, un petit nombre de protéines ont été conservées et sont impliquées dans ces trois étapes.

1.3.3.1 Ségrégation des Origines

Les cellules eucaryotiques ont un cycle cellulaire pendant lequel les étapes de réplication, compaction des chromosomes et ségrégation sont séparées. Les bactéries, qui ont un cycle de multiplication beaucoup plus rapide, répliquent leur chromosome, le compactent et l'organisent en même temps, au fur et à mesure de la progression de la réplication du chromosome. Les Origines de réplication ont donc été étudiées de façon extensive : étant les premières régions répliquées, leur ségrégation donne la direction que le reste du chromosome va suivre. Pendant près de trois décennies, un modèle de ségrégation des origines a subsisté : l'hypothèse de Jacob, Brenner et Cuzin [Jacob *et al.* 1963] était que les Origines étaient ancrées à la membrane cellulaire et que la croissance de la bactérie pendant la réplication les éloignait progressivement l'une de l'autre. Mais depuis, il est clair que le mouvement des Origines est beaucoup plus soudain et rapide que l'élongation des cellules [Viollier *et al.* 2004], [Webb *et al.* 1998], [Fiebig *et al.* 2006]. De plus, l'élongation lors de la croissance se fait sur toute la longueur des cellules et pas seulement au milieu de la bactérie. En parallèle de ce modèle passif, des systèmes de ségrégation actifs ont été découverts chez les plasmides [Abeles *et al.* 1985]. Ces systèmes de partition sont indispensables au maintien dans les cellules-filles des plasmides à petit nombre de copies [Schumacher 2008]. De façon étonnante, beaucoup d'espèces bactériennes possèdent des équivalents bactériens de ces systèmes de partition (*par*), notamment *Bacillus subtilis* [Ireton *et al.* 1994], [Lin & Grossman 1998], *Caulobacter crescentus* [Mohl & Gober 1997] et *Vibrio cholerae* [Heidelberg *et al.* 2000]. *Escherichia coli* et les espèces proches par contre, ne possèdent pas un tel système.

Le système de partition *parABS* Les systèmes de partition chromosomiques et plasmidiques sont constitués de deux gènes *parA* et *parB* ainsi que d'un site d'action en *cis*, *parS*. Ce site est présent en plusieurs copies, presque toujours à proximité de l'Origine [Livny *et al.* 2007], et semble agir comme un centromère : chez les eucaryotes, les chromosomes-soeurs sont séparés par un système mitotique qui se fixe au centromère et entraîne tout le chromosome vers la cellule-fille à partir de ce point d'attache. Le système *Par* semble être l'équivalent bactérien de la machinerie eucaryote. Néanmoins, parce que les origines sont séparées bien avant que le reste du chromosome ne soit entièrement répliqué, le système *Par* semble n'aider à ségréger que les Origines. La protéine *ParB* se fixe à l'ADN, spécifiquement sur les séquences *parS*, et forme ainsi un large complexe nucléo-protéique près de l'Origine du chro-

mosome. La protéine ParA est une ATPase qui a la capacité de se fixer à l'ADN de façon aspécifique. Elle agit sur le complexe *parS*-ParB et utilise le nucléoïde pour tirer les Origines répliquées vers des pôles opposés [Vecchiarelli *et al.* 2010]. Il existe plusieurs types de systèmes de partition [Gerdes *et al.* 2000], classés selon le type d'NTPases : Les loci *par* de Type I sont les plus communs et codent pour des ATPases Walker-box déviantes. Les exemples les plus connus sont les ParA des plasmides pB171, F et P1. Tous les loci *par* chromosomaux codent pour des ATPases de Type I Walker-box. Les loci de Type II codent pour des ATPases de type actine, comme par exemple ParM du plasmide R1, et sont moins fréquents [Salje *et al.* 2010]. Les loci de Type III codent pour des GTPases homologues de la tubuline (comme FtsZ) et ont été identifiés sur des plasmides de bactéries Gram-positives [Aylett *et al.* 2010].

les systèmes de partition de Type I Les loci *par* de Type I ont été divisés en deux sous-catégories : Les ParA de type Ia possèdent un domaine N-terminal de fixation à l'ADN qui sert à l'autorégulation de l'expression des gènes *par*. Les ParA de type Ib ne possèdent pas un tel domaine [Bouet & Funnell 1999], [Dunham *et al.* 2009]. Pour les deux sous-catégories, la protéine ParB entre en contact avec les sites *parS* via son extrémité C-terminale. Pour les loci *par* de Type Ib, si la protéine ParA est de petite taille, les protéines ParB autorégulent la transcription de l'opéron *par* en réprimant un promoteur situé dans la région "centromère" [Gerdes *et al.* 2010]. Les mécanismes moléculaires permettant aux loci *par* Ia et Ib de fonctionner sont malheureusement mal compris. Néanmoins, il a été montré que ces loci sont capables de ségréger et distribuer des plasmides uniformément, à équidistance les uns des autres, sur le nucléoïde [Ringgaard *et al.* 2009], [Sengupta *et al.* 2010], [Hatano *et al.* 2007]. Cette observation permet déjà de tirer plusieurs conclusions : - les loci *par* de type Ia et Ib fonctionnent de la même façon et les mécanismes leur permettant de stabiliser des plasmides semblent être les mêmes. - Ils sont capables de distribuer les plasmides en plusieurs clusters de façon ordonnée et à équidistance, quelque soit le nombre de copies des plasmides ou le nombre de cluster. Il est donc peu vraisemblable que la répartition des plasmides soit faite en les attachant à des récepteurs spécifiques de la cellule-hôte. - Afin d'assurer une répartition ordonnée, les systèmes *par* doivent constamment adapter le positionnement des plasmides en fonction de l'élongation de la cellule et du nucléoïde. Des modélisations mathématiques ont permis de conclure que ParA tire les plasmides plutôt que de les pousser [Ringgaard *et al.* 2009], [Sengupta *et al.* 2010], [Fogel & Waldor 2006], [Ptacin *et al.* 2010].

Différentes hypothèses pour expliquer le mécanisme de ParABS Afin d'expliquer les mécanismes de ségrégation des systèmes *par* de type Ia et Ib, deux modèles s'affrontent : un où ParA forme un filament à travers le nucléoïde, l'autre où ParA se fixe au nucléoïde sous forme de dimère ou de petit oligomère et prend part à un mécanisme de diffusion en cliquet (c'est à dire sans retour en arrière pos-

sible). Les premières données obtenues *in vitro* ont montré la capacité de ParA à former des filaments en présence d'ATP et à dépolymériser au contact de ParB. Les filaments ont été observés directement par Microscopie Électronique, avec les ParA de *Caulobacter crescentus*, *Thermus thermophilus* (SoJ), du chromosome II de *Vibrio cholerae* (ParA2) et des plasmides F, P1, pB171 et TP228 [Ptacin *et al.* 2010], [Ebersbach *et al.* 2006], [Dunham *et al.* 2009], [Bouet *et al.* 2007], [Hui *et al.* 2010]. Les expériences, à la fois à de hautes et basses concentrations de protéines ont permis de décrire de longs filaments.

Des observations *in vivo* sur le ParA du plasmide pB171, de *C. crescentus* et du chromosome I de *V. cholerae* en utilisant des fusions avec des protéines fluorescentes ont montré des signaux en "nuage" se déplaçant entre les deux pôles et sur le nucléoïde [Fogel & Waldor 2006], [Ptacin *et al.* 2010], [Ebersbach & Gerdes 2001]. En déconvoluant les images et en utilisant la microscopie à super-résolution, les signaux observés ont pu être résolus en structures de forme filamenteuse [Ringgaard *et al.* 2009], [Ptacin *et al.* 2010], [Ebersbach & Gerdes 2004]. De la microscopie à super-résolution chez *C. crescentus* a montré que ParA-YFP formait un filament qui s'étire entre le complexe ParB-*parS* et le vieux et le nouveau pôle [Ptacin *et al.* 2010]. L'hypothèse des auteurs a donc été que ParA forme un filament à travers le nucléoïde, que ParB vient se fixer au filament, mais que ce contact entraîne la dépolymérisation de l'extrémité du filament ParA. ParB (lié à *parS* dans un complexe nucléo-protéique autour de l'Origine du chromosome), reste attiré par ParA et migre légèrement afin d'entrer en contact avec du ParA polymérisé, mais ce contact dépolymérise l'extrémité du filament etc. C'est l'hypothèse du "pont en feu". Les conditions pour la polymérisation des différents ParA sont très variables et aucune propriété commune n'a été trouvée pour l'instant, de plus les structures formées sont parfois différentes (en hélice ou en filament). De plus, une des premières protéines décrite comme formant une structure faite de long filaments traversant la cellule, MreB, s'est révélée en fait ne pas former ces structures qui seraient en fait des artefacts d'observation. En effet, MreB fusionnée à une protéine fluorescente forme des filaments alors que la protéine native n'en forme pas [Swulius & Jensen 2012]. On peut donc se demander si les structures observées pour ParA, observées dans les mêmes conditions, ne sont pas elles aussi des erreurs d'interprétations.

Il existe de plus en plus de preuves que l'association de ParA avec le nucléoïde est nécessaire à la partition. ParA possède une activité de fixation non-spécifique à l'ADN, qui est indispensable à la partition ; en effet, une mutation qui endommage l'activité de fixation non-spécifique à l'ADN conduit à un défaut de partition *in vivo* [Hester & Lutkenhaus 2007], [Castaing *et al.* 2008]. *In vitro*, ParA se lie directement à l'ADN non-spécifique et la présence d'ATP est nécessaire ou améliore cette activité [Leonard *et al.* 2005], [Bouet *et al.* 2007], [Hester & Lutkenhaus 2007], [Castaing *et al.* 2008], [Pratto *et al.* 2008], [Hui *et al.* 2010], [Ptacin *et al.* 2010], [Vecchiarelli *et al.* 2010].

Des expériences de TIRFM (Total internal reflection fluorescence microscopy) ont montré que le ParA du plasmide P1 (fusionné à de la GFP) se fixait sur de l'ADN non-spécifique *in vitro* en présence d'ATP, et de façon dynamique

[Vecchiarelli *et al.* 2010]. En se liant à de l'ATP, ParA subit deux changements de conformation : une dimérisation, puis une étape qui rendrait le dimère (ParA-ATP)₂ capable de se lier à l'ADN. Cette étape, très lente, pourrait créer un délai entre le moment où ParA est relâché du nucléoïde après stimulation de l'activité ATPase par ParB, et la réacquisition de sa forme capable de se fixer à l'ADN. Ce délai est suffisamment long pour permettre à ParA de diffuser dans la cellule et de se fixer sur n'importe quelle partie du nucléoïde plutôt que de se refixer juste à côté d'où il a été relâché. Ainsi, ParB (et le plasmide) avance petit à petit vers une plus grande concentration de ParA (voir figure 1.17, p.37). Le délai dans le changement de conformation est essentiel pour cette hypothèse, mais ce n'est pas nécessairement un changement de conformation qui permettra d'avoir ce délai chez tous les ParA. N'importe quelle étape suivant l'hydrolyse et la dissociation de ParA de l'ADN peut faire l'affaire.

Le sort de ParB après interaction avec ParA n'est pas connu. On peut s'inspirer d'autres systèmes comme par exemple MinCDE chez *E. coli* : ce système sert à faire en sorte que la formation du septum et donc la division cellulaire se fasse toujours au centre de la cellule, en inhibant la division cellulaire partout sauf au centre de la cellule, et cela en oscillant tout au long de la cellule sur la membrane. MinD se fixe à la membrane et MinE stimule l'activité ATPase de MinD, ce qui entraîne son relargage dans la cellule. MinD recrute à la membrane l'inhibiteur de division cellulaire MinC [Lutkenhaus 2007]. En l'absence d'ATP, MinD se fixe uniformément à la membrane, tout comme ParA se fixe uniformément au nucléoïde en l'absence d'activité ATPase ou sans ParB. Ce système régule la division cellulaire grâce à la concentration des protéines dans la cellule : aux pôles, le ratio MinE/MinD est bas et MinE ne peut pas interférer avec la fixation à la membrane de MinD, alors qu'au centre de la cellule le ratio est tel que c'est le relargage de MinD qui domine. Et comme pour ParA, un délai entre le détachement et le réattachement de MinD est essentiel pour que le système fonctionne [Huang *et al.* 2003]. Pendant que le délai permet à MinD de diffuser au loin, MinE peut immédiatement interagir avec un MinD membranaire adjacent [Loose *et al.* 2011]. Cette "fixation permanente" est compatible avec la structure en co-cristal MinD/MinE, qui suggère un modèle "Tarzan" où MinE se balance d'un MinD à l'autre [Park *et al.* 2011]. Ainsi il est possible que de la même façon, après avoir stimulé le relargage d'un (ParA-ADP)₂, ParB interagisse immédiatement avec un (ParA-ATP)₂ adjacent. Aucune preuve ne permet de l'affirmer, mais cela expliquerait comment ParB parvient à détecter le gradient de ParA sur le nucléoïde, et comment il arrive à maintenir un lien dynamique entre le plasmide et ParA (voir encart figure 1.17, p.37).

Si les systèmes codés pour les plasmides semblent fonctionner de façon autonome, de plus en plus d'études suggèrent que les systèmes de partition codés par des chromosomes sont intégrés aux processus cellulaires. Dans la bactérie *C. crescentus*, le système de partition semble maintenir l'organisation du chromosome dans la cellule. En effet, après le début de la réplication, une des origines (avec un complexe *parS*-ParB) est tirée vers le pôle opposé, et ParB-*parS* et ParA sont maintenus au nouveau pôle par la protéine PopZ et TipN respectivement [Ebersbach *et al.* 2008],

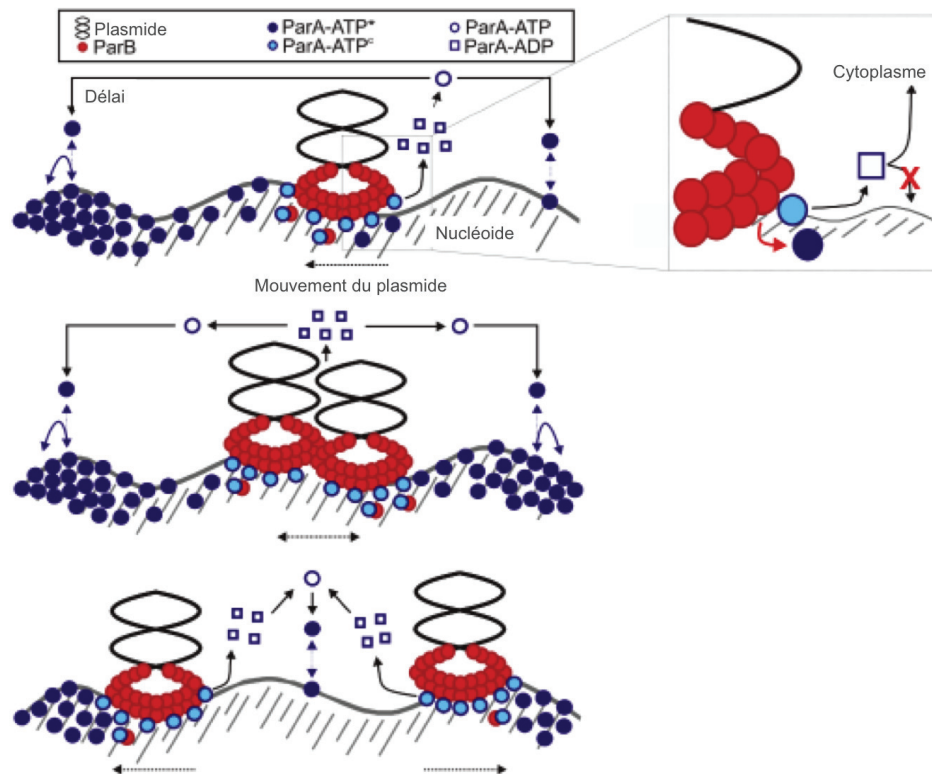


FIGURE 1.17 – Modèle de transport des plasmides par ParA grâce au nucléoïde. Par-ATP* se fixe au nucléoïde et ParB se fixe sur le plasmide. Les interactions entre ParB et ParA lié au nucléoïde (ParA-ATP^c) relient le plasmide au nucléoïde. L'activité ATPase de ParA est stimulé par ParB, ce qui dégage ParA-ADP du nucléoïde à proximité du plasmide. ParA échange un ADP contre un ATP et il y a un délai pendant le changement conformationnel qui crée ParA-ATP*. Ce délai permet à ParA de diffuser au hasard avant de se réassocier avec le nucléoïde. La redistribution continue des ParA liés au nucléoïde dirige le mouvement du plasmide. Après réplication, les plasmides ségrègent dans des directions opposées en allant vers de hautes concentrations de ParA lié au nucléoïde. *Encart* : Modèle de liaison permanente pour ParB. L'association ParA-ParB produit ParA-ADP, qui ne peut pas se lier au complexe de partition ou au nucléoïde, il est donc relâché dans le cytoplasme de la cellule. ParB au contraire, reste capable de se lier immédiatement à un autre dimère de ParA lié au nucléoïde. Tiré de [Vecchiarelli *et al.* 2012]

[Bowman *et al.* 2008], [Lam *et al.* 2006], [Schofield *et al.* 2010]. En l'absence de TipN, ParA a une dynamique oscillatoire similaire à celle observée pour les ParA plasmidiques. Ainsi, le système de partition contribue à maintenir l'organisation Ori-Ter du chromosome de cette espèce.

Ségrégation des origines sans système de partition La plupart des bactéries possèdent un système de partition, mais certaines, incluant *E. coli*, semblent ne pas en avoir, mais semblent tout de même avoir une ségrégation des origines suffisamment rapide pour être active [Li *et al.* 2002] [Lau *et al.* 2003]. De plus, lorsque le système Par est muté ou enlevé du génome, les effets sont minimes dans la plupart des espèces (sauf chez *C. crescentus* pour laquelle ce système est essentiel) : la ségrégation des origines est ralentie mais pas empêchée [Webb *et al.* 1998], [Ireton *et al.* 1994], [Fogel & Waldor 2006], [Lewis *et al.* 2002]. Le système de partition serait donc une façon pour la cellule de moduler et/ou de rendre plus précise la ségrégation des Origines, mais n'en serait pas le facteur déterminant. La condensation et la résolution des Origines peut expliquer leur séparation, mais pas leur ségrégation rapide vers les future cellules-filles. Il est possible qu'un système de ségrégation soit encore à découvrir chez ces espèces. Une autre hypothèse est que les Origines soient expulsées vers l'extérieur, poussées par l'accumulation d'ADN pendant la réplication. En effet, chez *E. coli*, deux régions près de l'Origine semblent avoir des propriétés de cohésion [Nielsen *et al.* 2006] [Joshi *et al.* 2011]. Elles maintiendraient les Origines répliquées proches l'une de l'autre, pendant que la réplication se poursuit. Puis, lorsque la pression de l'ADN condensé excède la force de ces snaps, les Origines seraient expulsées dans des directions opposées, vers les pôles. Les mécanismes d'action des snaps commencent à être connus, et semblent jouer un rôle majeur dans la ségrégation des chromosomes. La protéine SeqA, qui régule l'initiation de l'Origine de réplication en empêchant qu'elle soit réactivée trop tôt [Lu *et al.* 1994], semble être la protéine qui maintient les snaps [Joshi *et al.* 2013] et stabilise la cohésion entre chromatides soeurs en ayant une action antagoniste avec TopoIV. Néanmoins, ce modèle ne permet pas d'expliquer comment le positionnement de l'Origine peut guider le positionnement des réplichores gauche et droit de chaque côté.

1.3.3.2 Ségrégation du reste du chromosome

La compaction de l'ADN le long des réplichores semble être le facteur permettant la ségrégation des bras du chromosome. Ce modèle colle parfaitement avec l'observation que le chromosome est organisé de façon linéaire : plus un locus est proche de l'Origine sur la carte du chromosome, plus il en sera effectivement proche dans la cellule. De plus, des loci nouvellement répliqués sont ségrégés de façon séquentielle et vont colocaliser avec des loci voisins sur la carte du chromosome. La compaction du chromosome le long des réplichores se fait grâce aux protéines SMC, aux protéines "histone-like" et grâce au super-enroulement. Cette hypothèse est soutenue par le fait que des souches mutantes pour ces

1.3. Différents modèles et mécanismes de ségrégation des chromosomes 89

protéines ont des défauts de ségrégation [Britton *et al.* 1998], [Niki *et al.* 1991], [Jensen & Shapiro 1999], [Painbeni *et al.* 1997], [Sullivan *et al.* 2009]. De plus, une modélisation mathématique de deux anneaux flexibles constitués de polymères a montré qu'une compaction le long de leur longueur suffisait à les séparer et éviter qu'ils ne s'emmêlent, avec l'aide d'un système permettant de défaire les liens entre les anneaux, comme TopoIV par exemple [Marko 2009]. La compaction du chromosome sur lui-même est probablement initiée à l'Origine et propagée le long des réplichoes. D'ailleurs, les protéines SMC et MukBEF colocalisent fréquemment avec l'origine de réplication de *E. coli*, *C. crescentus* et *B. subtilis*. Chez cette dernière, le complexe SMC est recruté à l'Origine par ParB, lorsque ParB est fixée sur les sites *parS* [Sullivan *et al.* 2009], [Gruber & Errington 2009] et est également enrichi au niveau des gènes des ARNr (ARN ribosomaux), qui sont pour la plupart proche de l'Origine. Il est intéressant de remarquer que les sites *parS* sont à gauche de l'Origine alors que les ARNr sont du côté droit chez *B. subtilis*. Ainsi on suppose que les protéines SMC partent de ces points sur le chromosome pour condenser les deux bras.

L'organisation du chromosome serait donc dictée par cette organisation partant de l'origine. Une étude a ainsi montré qu'en mutant MukB chez *E. coli*, l'organisation *left-Ori-right* devenait une organisation en *Ori-ter* [Danilova *et al.* 2007]. Chez *C. crescentus* et *B. subtilis*, l'Origine est ancrée au pôle grâce au système de partition, mais les deux bras du chromosome sont tout de même spatialement séparés [Umbarger *et al.* 2011].

Une autre hypothèse pour expliquer la séparation des réplichoes, notamment chez *E. coli* chez qui les réplichoes sont positionnés de chaque côté de l'Origine, est que la ségrégation serait générée par la réplication : les brins leading et lagging sont répliqués de façon différente lors de la réplication. Ceci crée un biais dans la composition des deux réplichoes et dans le positionnement des gènes sur la carte du chromosome. Mais la réplication pourrait aussi créer un biais dans la vitesse de migration des réplichoes après réplication et affecter leur positionnement dans les cellules-filles. Ainsi, le brin lagging forme une boucle afin de permettre à l'ADN polymérase de synthétiser son brin complémentaire et de transloquer dans la même direction que l'ADN polymérase qui prend en charge le brin leading (et synthétise le brin complémentaire de façon continue). Même si cette boucle est petite, elle pourrait être suffisante pour retarder le brin lagging et le maintenir à proximité du complexe de réplication, alors que le brin leading pourrait ségréger aux pôles [White *et al.* 2008]. Cette hypothèse implique que les réplisomes soient localisés au centre des futures cellules, mais des observations ont montré que les complexes de réplication semblent se déplacer le long des réplichoes [Reyes-Lamothé *et al.* 2008].

1.3.3.3 Ségrégation du Terminus

Répliquer un chromosome circulaire peut causer deux sortes de problèmes : les caténanes et les dimères de chromosome. Lorsque les précaténanes (un emmêlement des chromatides-soeurs après réplication) n'ont pas été enlevés grâce à l'action de

la topoisomérase IV (Topo IV), les chromosomes-soeurs restent liés, enroulés l'un autour de l'autre et forment des anneaux liés, les caténanes. Les dimères de chromosome sont causés par la réparation par recombinaison homologue entre chromatides soeurs. Il arrive qu'il y ait un nombre impair de crossovers, et ainsi environ 15% d'une population se retrouve après la réplication avec un dimère de chromosome composé de deux chromosomes-soeurs joints [Steiner & Kuempel 1998]. TopoIV est donc chargée d'enlever les caténanes et des recombinases (appelées XerCD chez *E. coli* et RipX et CodV chez *B. subtilis*) sont chargées de provoquer un crossover supplémentaire afin de changer le dimère de chromosome en monomères. La résolution de dimères est coordonnée et facilitée par la protéine FtsK (SpoIIIE chez *B. subtilis*) ancrée dans la membrane cellulaire en compagnie du reste du complexe protéique de division. FtsK reconnaît des séquences KOPS [Bigot *et al.* 2005] dans le chromosome et se sert de leur orientation pour transloquer l'ADN afin de positionner les termini de réplication et le site de résolution des dimères *dif* au septum de division de la cellule. Puis FtsK active les recombinases XerC et XerD afin qu'elles provoquent un crossover qui permettra de séparer le dimère en deux monomères [Aussel *et al.* 2002]. Ces recombinases sont utilisées lorsque le dimère de chromosome ou les caténanes empêchent une séparation des deux chromosomes-soeurs au septum lors de la division.

De façon intéressante, il a été montré que la protéine FtsK n'agit pas que lorsqu'il y a des dimères de chromosome, mais participe activement à la ségrégation des chromosomes-soeurs d'*E. coli* qu'il y ait des dimères ou des monomères, grâce à son activité de translocation [Stouf *et al.* 2013]. Les loci *ter* migrent au centre de la cellule lors de la réplication. Ce mouvement est enclenché à la périphérie de la cellule [Meile *et al.* 2011] et pendant la réplication du *ter* [Éspeli *et al.* 2012], ce qui suggère que la réplication tire le *ter* vers le septum. Après réplication, la région est maintenue au centre de la cellule par le système MatP/*matS* qui interagit directement avec la machinerie de division *via* la protéine ZapB [Éspeli *et al.* 2012]. Cette interaction maintient les régions *ter* répliquées au septum et retarde leur ségrégation, les relâchant peu de temps avant la division. Ceci expliquerait pourquoi tous les termini observés jusqu'à maintenant se positionnent au centre de la cellule au moment de leur réplication et sont ségrégés peu de temps avant la division [Éspeli *et al.* 2012], [Viollier *et al.* 2004], [Vallet-Gely & Boccard 2013] [Teleman *et al.* 1998].

Les différentes techniques de microscopie et d'analyse génomique ont donc permis de passer d'une vision floue du nucléoïde bactérien à une image très précise permettant de dire que le chromosome bactérien est en fait organisé, compacté et orienté. Il reste important de réussir à comprendre par exemple comment les différents facteurs de compaction interagissent entre eux et avec les facteurs de ségrégation pendant la réplication et la ségrégation. On peut aussi chercher à comprendre comment les Origines sont ségrégées avec ou sans le système Par.

1.4 Les bactéries possédant plusieurs chromosomes

1.4.1 Plusieurs chromosomes, un intérêt d'étude

Sur la base d'informations limitées, on a longtemps cru que les bactéries n'avait qu'un chromosome. Or, depuis 1989 quand une analyse en gel d'électrophorèse en champ-pulsé a montré que le génome de *Rhodobacter sphaeroides* était réparti sur deux chromosomes circulaires [Suwanto & Kaplan 1989], il est apparu que certaines espèces bactériennes ont, comme les eucaryotes, un génome réparti sur plusieurs chromosomes. Des bactéries avec de multiples chromosomes ont été trouvés dans de nombreux phylums : chez les Actinobactéries, les Deinococcus-Thermus, les Firmicutes et les Protobactéries (de classe α , β et γ) par exemple, ce qui montre qu'elles sont apparues de façon indépendante, plusieurs fois au cours de l'évolution. Il apparaît aussi que toutes les bactéries appartenant à différentes classes du même phylum n'ont pas des génomes divisés. Ceci dit, des bactéries appartenant à la même famille, comme les *Vibrionaceae*, ont presque toujours des génomes divisés, ce qui indique que une fois séparés, il existe une pression sélective pour conserver un état multichromosomique. À ce jour, environ 10% des bactéries ont un génome divisé. On peut citer par exemple *Vibrio cholerae* qui possède deux chromosomes circulaires [Trucksis *et al.* 1998], [Yamaichi *et al.* 1999], [Okada *et al.* 2005], *Agrobacterium tumefaciens* qui possède à la fois un chromosome circulaire et un chromosome linéaire [Allardet-Servent *et al.* 1993], *Deinococcus radiodurans* qui possède deux chromosomes, un mégaplasmide et un plasmide, ou encore *Burkholderia cenocepacia* qui possède trois chromosomes circulaires [Rodley *et al.* 1995]. Il est intéressant de noter que les trois espèces citées ont toutes la capacité d'interagir avec un hôte. Ces bactéries permettent de comprendre comment cette répartition du génome sur plusieurs chromosomes a émergé, comment les génomes divisés évoluent, si les chromosomes communiquent entre eux pour synchroniser leur réplication et leur ségrégation, comment sont ségrégués les différents chromosomes et leur gestion en général, et quels peuvent être les avantages d'une telle organisation en plusieurs chromosomes.

La plupart des données accumulées viennent de l'étude de *Vibrio cholerae* qui est notre modèle d'étude au laboratoire et qui possède deux chromosomes, le chromosome I et le chromosome II qui ont une taille de 2.69 Mb et 1.07 Mb respectivement.

1.4.2 *Vibrio cholerae* comme modèle de cette étude

Vibrio cholerae a un génome réparti sur deux chromosomes circulaires [Trucksis *et al.* 1998], [Yamaichi *et al.* 1999], [Heidelberg *et al.* 2000] et est donc devenue un modèle d'étude pour les bactéries possédant plusieurs chromosomes. Ainsi ont été formulées de nombreuses hypothèses quant à l'utilité d'avoir un génome réparti sur plusieurs chromosomes : il est possible que la proportion des chromosomes dans la cellule ne soit pas de 1/1 mais que le chromosome I ou II soit plus ou moins amplifié selon les conditions de croissance de la cellule qui peuvent être très différentes (dans l'eau ou dans l'intestin Humain). Ou encore, comme la réplication des chromosomes se fait en même temps, le temps pour répliquer la même

quantité d'ADN, répartie sur un ou plusieurs chromosomes, n'est pas le même et avoir deux chromosomes pourrait apporter un avantage sélectif aux bactéries en leur permettant de se multiplier plus rapidement [Heidelberg *et al.* 2000].

Vibrio cholerae possède un chromosome de 2.96 Mb (chromosome I) et un chromosome de 1.07 Mb (chromosome II), qui ont été séquencés : la majorité des gènes essentiels au fonctionnement cellulaire et à la pathogénicité se trouvent sur le chromosome I alors que le chromosome II possède une grande proportion de gènes hypothétiques, à tel point que le chromosome II est soupçonné de dériver d'un mégaplasmide [Heidelberg *et al.* 2000].

1.4.2.1 La réplication des deux chromosomes

Les caractéristiques de l'Origine de réplication du chromosome I sont essentiellement les mêmes que pour celle du chromosome d'*E. coli* [Heidelberg *et al.* 2000], d'ailleurs, OriI peut substituer OriC dans *E. coli* sans problème [Demarre & Chattoraj 2010]. Pour ces deux chromosomes, la réplication est contrôlée par l'initiateur DnaA [Egan & Waldor 2003], qui est très conservé. Néanmoins, la réplication du chromosome II est régulée par un initiateur spécifique, RctB. Le chromosome II a une origine semblable à celle de plasmides d'*E. coli* [Heidelberg *et al.* 2000], qui possèdent des sites de fixations pour initiateurs, les iterons. Ceux-ci sont essentiels pour l'initiation de la réplication du plasmide et pour empêcher une ré-initiation trop précoce. Dans le chromosome II, les iterons sont essentiels pour l'initiation mais la ré-initiation est empêchée par des sites appelés 39-mers [Venkova-Canova & Chattoraj 2011]. L'initiateur de la réplication spécifique du chromosome II, RctB, se fixe à la fois sur les iterons et sur les 39-mers [Duigou *et al.* 2006], [Jha *et al.* 2012]. La fixation de RctB aux itérons est régulée par l'hémiméthylation de ces sites [Venkova-Canova & Chattoraj 2011], et l'activité des 39-mers est restreinte par plusieurs mécanismes : l'inactivation transcriptionnelle (le passage de la transcription sur les 39-mers empêche la fixation de RctB) ou les boucles d'ADN (un RctB fixé à un itéron interagit avec un autre RctB fixé sur les 39-mers). La présence de deux sites de fixation pour l'initiateur et des contrôles supplémentaires de la fixation de l'initiateur n'a pas été observé chez les plasmides, ce qui indique que la réplication du chromosome II est régulée plus finement que celle des plasmides.

Pour les chromosomes bactériens, la méthylation est la modification de l'ADN la plus fréquente, et est utilisée afin de contrôler plusieurs processus cellulaires [Suzuki & Bird 2008] en facilitant ou en interférant dans des réactions ADN-protéines, telles que l'expression des gènes, la réparation d'ADN ou encore la réplication [Lobner-Olesen *et al.* 2005]. Chez *E. coli*, la méthylase est appelée Dam et agit sur l'adénine des séquences GATC proches de l'Origine. Il faut que les deux brins d'ADN soit méthylés pour que la réplication soit initiée, mais juste après le passage de l'ADN polymérase, l'ADN est seulement hémiméthylé. Une réinitiation immédiate de la réplication est empêchée par la fixation de la protéine SeqA [Waldminghaus & Skarstad 2009], qui empêche l'action de la

méthylase Dam. Ainsi *E. coli* évite une méthylation et une réinitiation trop rapides [Nielsen & Lobner-Olesen 2008]. Aussi, en cas de réplication multiple, la séquestration de l'origine continue tant que toutes les origines présentes dans la cellule n'a pas été initiées. *E. coli* régule ainsi la réplication de ses origines en faisant en sorte qu'elles soient toutes initiées en même temps [Lobner-Olesen *et al.* 1994]. Dans des mutants *dam* ou *SeqA*, l'initiation n'est plus synchrone et certaines origines seront initiées plusieurs fois par cycle cellulaire alors que d'autres non, causant des problèmes de réplication, de ségrégation des chromosomes et donc de division cellulaire. On ne sait pas comment la méthylation aide la réinitiation, mais une des hypothèses est qu'elle aiderait à diminuer la stabilité de l'ADN et faciliterait ainsi l'ouverture de l'ADN au niveau des origines [Engel & von Hippel 1978]. Chez *Vibrio cholerae*, Dam est indispensable pour l'initiation du chromosome II, car l'ADN doit être complètement méthylé pour que RctB se fixe sur oriII. Et tout comme pour *E. coli*, SeqA est indispensable pour limiter l'initiation à une fois par cycle cellulaire pour oriI et oriII [Demarre & Chatteraj 2010]. De part sa régulation de l'initiation par la méthylation et différentes strates de contrôles, le chromosome II est donc bien un vrai chromosome. De plus, sa taille est d'environ 1/3 celle du chromosome I, et il initie sa réplication beaucoup plus tard que le chromosome I. Ceci expliquerait comment les chromosomes arrivent à finir leur réplication en même temps [Rasmussen *et al.* 2007].

1.4.2.2 Des ségrégations différentes pour les deux chromosomes

Les deux chromosomes de *Vibrio cholerae* possèdent leur propre système de partition. Les gènes *parAB* sont largement homologues mais de légères différences suffisent à les rendre spécifiques pour chaque chromosome [Fogel & Waldor 2006]. De la même façon, les trois chromosomes et le plasmide de *Burkholderia cenocepacia* ont tous des gènes *parAB* presque homologues mais spécifiques pour chaque réplicon [Dubarry *et al.* 2006]. La ségrégation du chrI et du chrII suivent des voies différentes. L'origine de réplication du chrI se duplique à un pôle. Une des origines reste et l'autre migre au pôle opposé [Fogel & Waldor 2006]. On retrouve cette chorégraphie chez *Caulobacter crescentus* [Viollier *et al.* 2004] et *Bacillus subtilis* en sporulation [Ben-Yehuda & al. 2005], ainsi que chez les chromosomes I des bactéries qui possèdent également plusieurs chromosomes *Agrobacterium tumefaciens* et *Sinorhizobium meliloti* [Kahng & Shapiro 2003]. Son terminus se situe au pôle opposé au début de la réplication, puis migre au centre de la cellule [Srisvastava *et al.* 2006], tout comme le terminus du chromosome de *C. crescentus* [Viollier *et al.* 2004]. Il ségrège à la toute fin du cycle cellulaire juste avant la division.

La chorégraphie de ségrégation d'OriII est complètement différente : la réplication du chromosome II est initiée au centre de la cellule, puis les origines répliquées migrent de façon symétrique aux positions $\frac{1}{4}$ et $\frac{3}{4}$ de la cellule en cours de réplication. Cette chorégraphie est similaire à celle des plasmides P1 et F [Niki & Hiraga 1999] et aussi à celle des chromosomes d'*E. coli* et de *B. subtilis* végétatif. Le terminus du chromosome II est à une position intermédiaire entre l'oriII et le terminus du

chromosome I juste après la division. Il migre au centre de la cellule et après réplication, les *ter*II répliqués migrent aux positions qu'ils occuperont dans les futures cellules [Srisvastava *et al.* 2006], bien avant la division. Ceci n'avait pour l'instant jamais été observé auparavant pour des termini d'autres espèces, qui se ségrègent très peu de temps avant la division [Teleman *et al.* 1998], [Viollier *et al.* 2004], [Éspeli *et al.* 2012], [Vallet-Gely & Boccard 2013]. On peut donc émettre l'hypothèse que le chromosome II de *Vibrio cholerae* a peut être gardé une organisation et une ségrégation plasmidiques. *Vibrio cholerae* maintient ainsi deux chorégraphies qui (en tout cas concernant les origines et les terminus) semblent différentes, contrairement à ce qui avait été observé dans d'autres bactéries possédant plusieurs chromosomes, dont les origines colocalisaient toutes à un pôle [Kahng & Shapiro 2003]. Il est possible que cette caractéristique ait été sélectionnée afin d'éviter une compétition entre les chromosomes pour de l'espace, ou que la chorégraphie du chromosome II soit différente car d'origine plasmidique.

1.4.2.3 Communication entre la réplication et la ségrégation

Nous avons vu au début de l'introduction que la réplication pouvait influencer la ségrégation. Mais l'inverse est également possible : pour le chromosome II, une compétition de ParB2 avec RctB a été observée, pour se fixer aux 39-mers : ainsi, le système de partition *via* ParB2 promeut la réplication du chromosome II en empêchant l'inhibition de la réplication par RctB [Venkova-Canova *et al.* 2013]. Pour le chromosome I également, la protéine parA1 contrôle l'initiation de la réplication en interagissant avec DnaA [Kadoya *et al.* 2011].

Le système de partition *parABS* du chromosome I n'est pas essentiel et sa délétion ne semble qu'avoir peu d'effets sur la ségrégation du chrI et aucun sur le chrII. Mais le système de partition du chrII est lui essentiel : dans des souches $\Delta parAB2$, le chromosome II n'est plus ségrégué activement dans les cellules-filles. Ainsi, 75% des cellules ne possèdent pas de chromosome II après division [Yamaichi *et al.* 2007]. Ces cellules sont capables de se diviser une nouvelle fois mais meurent par la suite en développant un phénotype CHUB (pour "Condensed nucleoid, Hypertrophic, Undividing Bacteria"). Le chromosome II code pour plusieurs systèmes toxine-antitoxine, et il semblerait que la mort cellulaire en CHUB soit causée par l'un d'entre eux : le système ParDE [Yuan *et al.* 2011]. Les systèmes toxine-antitoxine ont d'abord été décrits chez les plasmides à faible nombre de copies, comme F, R1 ou RK2 : ils favorisent la maintenance des plasmides en provoquant la mort des cellules-filles qui n'ont pas le plasmide. En effet, ces plasmides produisent une toxine qui en général inhibe la synthèse d'ADN ou protéique [Melderen & Bast 2009] mais également l'antitoxine. Tant que le plasmide est dans la cellule, le système est à l'équilibre et la cellule se développe normalement. Mais si une cellule-fille n'a plus de plasmide, l'antitoxine est dégradée très rapidement et ne peut plus inhiber la toxine qui a une durée de vie beaucoup plus longue, ce qui va entraîner la mort de la cellule. De la même façon, le chromosome II de *Vibrio cholerae* se maintient grâce à un système toxine-antitoxine, ce qui est un indice de plus quant à son origine

plasmidique.

1.4.3 Un modèle abordable

Vibrio cholerae est un modèle d'étude qui commence à émerger parmi les bactéries. En effet, la plupart des outils en microbiologie ont été développés pour *E. coli*, et *Vibrio cholerae* en est (évolutivement parlant) très proche [Heidelberg *et al.* 2000], ce qui permet d'utiliser les outils, notamment de recombinaison, indifféremment chez les deux espèces. De plus, lorsque *V. cholerae* est cultivée sur des carapaces de crustacés de façon à former un biofilm, elle est capable de devenir compétente : les bactéries développent des pili de type IV leur permettant de capturer l'ADN environnant et d'acquérir ainsi de nouveaux gènes [Meibom *et al.* 2005]. Cette compétence naturelle peut être utilisée afin d'insérer des mutations facilement dans le génome de *V. cholerae*, en la cultivant sur de la chitine et en lui "fournissant" un ADN contenant la mutation voulue, qu'elle se chargera elle-même de capturer et d'insérer dans son génome par recombinaison [Marvig & Blokesch 2010]. De façon intéressante, bien que proche d'*E. coli*, *Vibrio cholerae* a la même morphologie que *Caulobacter crescentus*, en forme de croissant avec un seul flagelle à un pôle. Elle n'a cependant pas le même cycle cellulaire : *C. crescentus* a une division asymétrique, débutant à partir d'une cellule mobile, qui va perdre son flagelle et produire un pied de fixation, la division permet d'obtenir une cellule-fille mobile avec un flagelle et une cellule-fille fixe avec un pied de fixation. *Vibrio cholerae* a une division symétrique, où les cellules sont toujours mobiles avec un flagelle. Néanmoins, la chorégraphie d'*oriI* et *terI* sont très proches de la chorégraphie de ségrégation de l'*ori* et le *ter* du chromosome de *C. crescentus*. De plus, les deux chromosomes de *V. cholerae* sont dotés de systèmes de partition, et le système *parABS* du *chrI* est très proche de celui de *C. crescentus*. D'un autre côté, l'*OriI* est quasi similaire à celle d'*E. coli* [Heidelberg *et al.* 2000] et *Vibrio cholerae* fait partie des rares espèces suffisamment proches d'*E. coli* (avec les Enterobacterales, les Pasteurellales, les Vibrionales et les Alteromonadales) pour avoir gardé un gène *Dam* "résident" et tous les gènes qui ont coévolué avec *Dam*, notamment *SeqA*. Ces gènes sont tous potentiellement liés à la maintenance de l'ADN [Brézellec *et al.* 2006]. De plus, *V. cholerae* possède un système *MatP-matS*, qui a été décrit chez *E. coli*, mais aucun système d'organisation du *Ter* n'a été décrit chez *C. crescentus* [Mercier *et al.* 2008]. Ainsi, *Vibrio cholerae* partage beaucoup de points communs avec les deux espèces, et apparaît comme étant au croisement évolutif entre *E. coli* et *C. crescentus*.

1.4.4 les *Vibrionaceae*, un intérêt médical et environnemental

Les *Vibrios* sont des bactéries Gram-négatives, qui englobent 60 espèces qui sont répandues dans les environnements côtiers et les estuaires. L'espèce la plus documentée est *Vibrio cholerae*, mais d'autres espèces sont des pathogènes dévastateurs pour les poissons, les crustacés, ou le corail. Par exemple *V. parahaemolyticus* peut causer une mortalité dans les huîtres, d'autres fruits de mer comme les abalones et chez les

crevettes. Ingérer des fruits de mer contaminés par cette bactérie peut provoquer des gastro-entérites aiguës chez les Humains [DePaola *et al.* 2003]. Une autre bactérie, *V. vulnificus*, cause des hémorragies chez les anguilles [Austin & Austin 2007], et plusieurs infections chez l'Humain ont été rapportées, principalement des plaies ouvertes ayant dégénéré en septicémies [Mouzopoulos *et al.* 2008]. Mais d'autres *Vibrios* non pathogènes sont aussi connus : par exemple *V. mediterranei* joue un rôle dans la colonisation de l'intestin des larves de turbo, et pourrait empêcher l'installation de bactéries opportunistes [Huys *et al.* 2001] alors que *V. fischeri* joue un rôle important dans le développement de l'organe lumineux de la pieuvre *Euprymna scolopes* [Visick *et al.* 2000].

Les bactéries *Vibrio cholerae* produisant la Toxine Cholérique sont responsables du choléra chez l'Humain. On trouve principalement cette bactérie dans l'eau, elle est halotolérante et survit très bien dans la mer, les estuaires et les rivières. Sa caractéristique principale est de pouvoir survivre dans plusieurs milieux, parfois très différents : elle peut être libre dans l'eau, fixée à des carapaces de crustacés dans l'océan ou encore dans l'épithélium du petit intestin humain. Le choléra est provoqué par l'ingestion d'eau contaminée par la bactérie. Elle ne résiste pas bien à l'acidité de l'estomac, ce qui veut dire qu'il faut ingérer un grand nombre de bactéries pour provoquer le choléra. Une fois passée la barrière qu'est l'estomac, *V. cholerae* va coloniser le petit intestin et sécréter la Toxine Cholérique. Cette toxine va perturber le transport d'ions par les cellules épithéliales de l'intestin, ce qui provoque une perte d'eau et d'électrolytes et ainsi des diarrhées sans fièvre, qui peuvent être mortelles si le patient n'est pas réhydraté à temps. Prise à temps, c'est une maladie dont le taux de mortalité passe sous les 1%. Ce n'est malheureusement pas le cas dans de nombreux pays en développement où les règles d'hygiène évitant des contaminations ne peuvent être appliquées et où le choléra fait encore de nombreuses victimes.

Ainsi l'étude de *Vibrio cholerae* présente un intérêt médical, mais également par extension aux autres *Vibrio*, un intérêt environnemental non négligeable.

L'impact des sites *parS1* et *oriC1* sur l'organisation du chromosome I de *Vibrio cholerae*

Sommaire

2.1	Introduction	48
2.2	The two cis-acting sites, <i>parS1</i> and <i>oriC1</i>, contribute to the longitudinal organisation of <i>Vibrio cholerae</i> chromosome I	50
2.2.1	Abstract	51
2.2.2	Introduction	51
2.2.3	Results	53
2.2.3.1	Sequential order of duplication of chromosomal DNA in <i>V. cholerae</i>	54
2.2.3.2	Longitudinal organisation of Chromosome I and II	54
2.2.3.3	Impact of <i>parS1</i> deletion on chromosome I organisation	56
2.2.3.4	Impact of <i>parS1</i> displacement on chromosome I organisation	56
2.2.3.5	Impact of an extra <i>oriC1</i> at 650kb on chromosome I organisation	57
2.2.4	Discussion	58
2.2.5	Material and Methods	62
2.2.5.1	Strains and Plasmids	62
2.2.5.2	Fluorescence Microscopy	62
2.2.6	Acknowledgments	62
2.2.7	References	62
2.2.8	Figures	66
2.2.9	Supplementary Materials, TextS1	70
2.2.10	Supplementary References	72
2.2.11	Supplementary Tables	73
2.2.12	Supplementary Figures	75
2.3	Discussion	90

2.1 Introduction

La majorité des chromosomes bactériens sont dotés d'un système de partition, avec des sites *parS* positionnés autour de l'unique origine de réplication [Livny *et al.* 2007]. Chez *Vibrio cholerae*, chaque chromosome possède son propre système de partition spécifique [Yamaichi *et al.* 2007].

Cet article se concentre sur l'étude de la chorégraphie de ségrégation des deux chromosomes de *Vibrio cholerae*, en croissance dans un milieu minimum sans réplication multiple des chromosomes. 12 loci sur le chromosome I et 4 loci sur le chromosome II ont été marqués par FROS (Fluorescent repressor-operator system) et observés par microscopie de fluorescence. À partir des images de population, la ségrégation des différents loci a été reconstituée en fonction de la taille des cellules et donc de leur âge. Ainsi la chorégraphie de ségrégation des deux chromosomes a été reconstituée : juste après la division, le chromosome I adopte une organisation longitudinale, avec l'*ori_I* au vieux pôle, le *ter_I* au nouveau pôle, et les deux réplichores entre les deux, de façon séquentielle selon la carte du chromosome. Le chromosome II adopte une organisation longitudinale également, mais un positionnement dans la cellule différent du chromosome I : *ori_{II}* est au centre de la cellule, le *ter_{II}* entre *ori_{II}* et *ter_I*, et le reste du chromosome entre les *ori_{II}* et *ter_{II}*. Ces positionnements différents dans la cellule ont peut-être été sélectionnés pour éviter une compétition pour de l'espace entre les deux chromosomes. De plus, les deux systèmes de partitions étant différents, ils entraînent peut-être des chorégraphies différentes : le système *parABS1* est très proche de celui de *C. crescentus* et *ori_I* a justement un positionnement identique à l'*ori* de *C. crescentus*. De la même façon, le système *parABS2* est plus proche des systèmes de partitions que l'on trouve chez les plasmides, et le positionnement de *ori_{II}* est similaire à certains plasmides d'*E. coli*.

Nous avons cherché à connaître les mécanismes gouvernant le positionnement du chromosome I dans la cellule. En effet, bien que très proche d'*E. coli*, [Heidelberg *et al.* 2000], et ayant les mêmes mécanismes de régulation de la réplication [Demarre & Chattoraj 2010] et de l'organisation du domaine Ter [Mercier *et al.* 2008], la chorégraphie du chromosome I est totalement différente de celle du chromosome d'*E. coli* mais très semblable à celle de *C. crescentus*. La différence la plus notable entre le chromosome d'*E. coli* et le chromosome I de *V. cholerae* est la présence d'un système de partition *parABS1* que *E. coli* ne possède pas et qui est fortement homologue à celui de *C. crescentus*. Néanmoins, la délétion du système de partition du chromosome I ne semble pas affecter ni le positionnement du chromosome I, ni le cycle cellulaire de la cellule.

Le déplacement des sites *parSI* à distance de l'*ori_I* a causé une rotation dans l'organisation longitudinale du chromosome I. Notamment, un déplacement des sites *parS1* au milieu d'un réplicore à équidistance de *ori_I* et de *ter_I* a causé un

repositionnement de ce locus non plus au milieu de la cellule, mais au vieux pôle et l'*ori_I* non plus au pôle mais au milieu de la cellule. Cette étude révèle également l'impact clair de la réplication sur le positionnement du chromosome. En insérant une origine de réplication supplémentaire sur le chromosome dans une souche $\Delta parABS1$, le locus à proximité a été repositionné du milieu de la cellule vers le pôle.

De nombreux facteurs redondants entrent en jeu dans le positionnement des chromosomes bactériens. La proximité sur la carte du chromosome des sites *parS1* et *oriI* pourrait avoir été sélectionnée afin de créer une synergie dans l'action de ces deux sites pour positionner l'Origine au pôle.

2.2 The two cis-acting sites, *parS1* and *oriC1*, contribute to the longitudinal organisation of *Vibrio cholerae* chromosome I

Ariane David^{1,2}, Gaëlle Demarre^{1,2}, Evelyne Paly^{1,2}, François-Xavier Barre^{1,2,*}
and Christophe Possoz^{1,2,*}

¹ CNRS, Centre de Génétique Moléculaire, 91198 Gif-sur-Yvette, France

² Université Paris-Sud, 91405 Orsay, France

* Co-corresponding authors

Email : barre@cgm.cnrs-gif.fr and possoz@cgm.cnrs-gif.fr

Tel : +00 33 169 823 224

Fax : +00 33 169 823 160

Paper in reviewing process in PLOS Genetics

Running title : *Vibrio cholerae* chromosomes organisation

2.2.1 Abstract

In the course of their segregation, bacterial chromosomes follow a precise choreography of spatial organisation initiated by the bipolar migration of the sister copies of the replication origin (*oriC*). Most bacterial chromosomes harbour a partition system with *parS* sites in close proximity to *oriC*. Chromosomal *par* systems contribute to the active mobilisation of the *oriC* region towards the old pole. This is thought to result in a longitudinal chromosome arrangement within the cell.

We studied the choreography of the two *V. cholerae* chromosomes, in growth without overlapping replication cycles, visualizing 12 loci on chromosome I and 4 loci on chromosome II. At birth, the chromosome I adopted a longitudinal organisation anchored at the old pole by *oriC1* region and at the new pole by the terminus region. The intermediate loci were layering sequentially in between in the order of the genetic map. The chromosome II adopted a longitudinal organisation with the origin region at midcell and the terminus region localising to an intermediate position between midcell and the new pole. We demonstrated that the *parS1* sites were sufficient to nucleate the longitudinal shaping of chromosome I. The displacement of *parS1* sites away from *oriC1* led to the rotation of the longitudinal organisation. Notably, *parS1* displacement toward mid-replication arm shifted the positioning of the *oriC1* region toward midcell. Reciprocally, the positioning of a *parS1*-proximal locus was shifted to the old pole. However, the longitudinal arrangement of the chromosome I persisted in *par* mutants. In addition, introduction of an *oriC1* site in the proximity of a locus normally positioned at midcell led to its polar positioning, which further suggested that the replication program directly contributed to the arrangement of chromosome I. The genomic proximity between *parS* and *oriC* sites could be conserved for the convergence of their polar positioning activities.

2.2.2 Introduction

Bacterial chromosome replication is initiated from a unique origin (*oriC*) and progresses bidirectionally. In most bacteria, chromosomes are circular. Replication terminates in a region opposite of the *oriC* region on the circular map, the terminus (Ter), in which is located a site-specific recombination site dedicated to the resolution of chromosome dimers, *dif* [1]. This defines two replication arms, Left and Right, mirrored by the *oriC-dif* replication axis. Detailed investigation of the choreography of chromosomal movements during the cell cycle of several monochromosomal bacteria indicated that segregation is concurrent with replication and starts with the precise positioning of newly replicated sister copies of the *oriC* region into opposite cell halves [2,3,4]. As replication progresses, sister copies of newly replicated loci are rapidly segregated towards their future daughter cell positions [2,3,4]. Sister Ter copies are segregated last [2,3,4]. In several species,

sister Ter copies even seem to lag at midcell until the very end of cell division. In *Escherichia coli*, this is due to the MatP/*matS* Ter organization system [5,6,7]. There is much less data on the choreography of chromosome segregation in bacteria with multipartite genomes. However, analysis of the positioning of a single locus in the *oriC* region and of a single locus in the putative Ter of each of the two circular chromosome of *Vibrio cholerae*, chromosome I and chromosome II, globally fitted with this general scheme [8,9,10]. Taken together, these observations suggested that it was the active positioning of the *oriC* region that set the pace for chromosome segregation, which raised a lot of interest for the underlying mechanisms.

A specific partition system is encoded on each of the two *Vibrio cholerae* chromosomes, as in most bacteria [11]. Bacterial chromosome partition machineries are related to the Type I partitioning systems of plasmids. They consist of two genes, *parA*, which codes for an ATPase, and *parB*, which codes for a sequence-specific DNA binding protein that is able to spread around its binding site, *parS* [12]. Several *parS* sites are usually found on bacterial chromosomes. They are grouped in a small region close to *oriC* on the circular map of the chromosome but might in addition spread in a larger region encompassing *oriC* [11]. The role of *par* systems in DNA segregation was clearly established for low-copy number plasmids [12,13]. However, their role in bacterial chromosome segregation remains controversial, notably because disruption of the *par* system of different bacterial chromosomes yields widely different phenotypes : the *par* systems of the *Caulobacter crescentus* chromosome, the *Myxococcus xanthus* chromosome and *V. cholerae* chromosome II are essential [14,15]. Likewise, the impairment of *par* of the *Pseudomonas aeruginosa* chromosome causes the formation of numerous anucleated cells, ~20% of the cell population [3]. However, disruption of *par* affects much fewer cells (less than 5%) in *Streptococcus pneumoniae* and *Bacillus subtilis* [16,17], it yields no segregation defect for *V. cholerae* chromosome I [18]. In addition, partition systems appear to contribute to other cellular processes than chromosome segregation : they have been implicated in replication initiation [19,20], in cell cycle coordination (Harms et al., 2013)[14] and chromosome compaction [17,21,22]. Finally, when the implication of *par* in chromosome segregation can be proposed, it is not necessarily due to its active positioning activity : ParB-binding to *oriC*-proximal *parS* sites helps recruit SMC proteins to the origin region in *B. subtilis* and *S. pneumoniae*, which contributes to chromosome segregation even in the absence of ParA.

Nevertheless, *par* systems were directly involved in the polar positioning and the active bipolar migration of the *oriC* region of the *C. crescentus* chromosome and of *V. cholerae* chromosome I [10,23,24,25,26]. The polar anchoring mechanisms have been described [27](Yamaichi, Bruckner et al. 2012). Strikingly, all the chromosomes encoding a *par* system whose intracellular arrangement has been characterized in detail display a similar longitudinal organisation, in which the replication arms extend over the longitudinal cell axis, the *oriC* region being positioned towards the old pole and Ter being positioned towards the new pole

[42,43](Vallet-Gely and Boccard 2013) (Harms *et al*, 2013). The polar localisation of the *oriC* region of *Vibrio* chromosome I [30] and of the multiple chromosomes of *S. meliloti* and *A. tumefaciens* [31] suggested a similar longitudinal organisation. In contrast, the *E. coli* chromosome, which seems devoid of a *par* system, adopts a transversal organisation in which the *oriC* region is positionned at midcell and the Left and Right chromosomal arms extend toward opposite cell halves [42,43]. Taken together, these results suggested that it was the active positioning of the *oriC* region towards the old cell pole by *par* systems that generated the longitudinal organisation observed for most bacterial chromosomes.

Here, we took advantage of the fact that disruption of the *par* system of *V. cholerae* chromosome I did not affect any step of the cell cycle to evaluate its contribution of the general arrangement of chromosomes within the cell. First, we demonstrated that *V. cholerae* chromosome I adopted a longitudinal organisation, the position of 12 loci scattered around chromosome I sequentially extending from the old pole to the new pole. The analysis of 4 loci on chromosome II revealed that it also adopted a longitudinal arrangement within the younger half of the cell, from midcell to the new pole. We then demonstrated the preponderant contribution of the *par* system of chromosome I in its longitudinal arrangement by displacing *parS1* sites away from *oriC*. However, the *parS1*-deleted chromosome I remained longitudinal, which suggested the existence of another system contributing to this longitudinal organisation. We then showed that the addition of an ectopic *oriC* near a locus localised in the middle of one of the two chromosome arms shifted the position of this locus toward the old pole. Thus, initiation of replication at *oriC* contributes by itself to the longitudinal arrangement from *oriC* to *Ter* of *V. cholerae* chromosome I.

2.2.3 Results

Tagging of the two *V. cholerae* chromosomes with fluorescent labelling systems The spatial organisation of chromosomes I and II were deduced from the positioning of 12 and 4 loci, respectively. They were distributed so as to homogeneously cover the genome pointing on crucial loci such as the origins of replication (loci named *ori_L* and *ori_R*) and the terminus dimer resolution site *dif* sites (loci named *ter_L* and *ter_R*) ([1] [34] and Figure 1A). 5 loci were tagged on the Left (named L1_L to L5_L) and on the Right (named R1_L to R5_L) replication arms of chromosome I. Only one locus by replication arm of chromosome II was tagged (named LII and RII). The loci were visualised in pairwise combination using two compatible fluorescent labelling system : a *lacO* array was inserted at one of the loci and a *parS_{pMT1}* site at the other loci. LacI-mCherry and yGFP- Δ 30ParB_{pMT1} (Nielsen et al, 2006) protein gene fusions were introduced as an operon in place of the *V. cholerae lacZ* gene. A third loci was visualized in some cells using a *tetO* array and the production of a TetR-Cerulean fusion from a plasmid. We observed the same pattern of localization of the L3_L locus during the cell cycle whether it was tagged with a *lacO*

array or with a *parS*_{MT1} site, suggesting that these two systems did not affect the positioning of the chromosomal loci under the expression conditions. Likewise, we observed the same pattern of localization of the *ter*_I locus during the cell cycle, whether it was tagged with a *lacO* array or with a *tetO* array.

Methodology of analysis of chromosome choreographies To avoid any complications linked to multiple concurrent rounds of replication, cells were cultivated at 37 ° C in slow growing conditions (M9 Fructose supplemented with thiamine) characterised by a 55min generation time divided in successive three periods : a 11min before replication initiation (B period), a 32min-long replication period (C period) and 12min after replication and before division (D period) [35]. A chromosome choreography is the successive steps of chromosome organisation in function of the cell cycle progression. Cell elongation being correlated with the cell cycle, we studied the organisation of the chromosomes within cells in 0.2μm cell size intervals from the smallest ($\leq 1.8\mu\text{m}$) to the longest cells ($\geq 4\mu\text{m}$) called hereafter, newborn and dividing cells, respectively. The cell population of the different cells studied had similar cell size distribution (Figure S1), which allowed us to compile the data obtained with the different loci on the same graphs to represent a comprehensive picture of their choreography.

2.2.3.1 Sequential order of duplication of chromosomal DNA in *V. cholerae*

We analysed the proportion of cells in which two foci of any given locus were observed as a function of cell size (Figure 1B). In newborn cells, the duplication ratio was null independently of the locus considered. This is consistent with our growth conditions, which generate newborn cells containing a unique non-replicating copy of each chromosome. Likewise, two foci were observed for most of the loci in 90% of the dividing cells. The only exceptions were R5_I and *ter*_I, whose foci were found to be duplicated in less than 30% and 10% of the cells, respectively. This is coherent with a previous report that indicated that sister copies of a locus situated at 40kbp from *dif1* remained colocalized until the very end of septation (Fekete Chatteraj). Outside of the loci corresponding to chromosome I Ter domain but L5_I locus, the rate of focus duplication of any given locus was relatively similar : the proportion of cells in which two foci could be observed increased abruptly from $< 10\%$ to $> 80\%$ within 2 size intervals, i.e. within 0.4μm of elongation. Finally, our results indicated that the order of duplication followed the genetic map from *ori* to *ter* along the two arms of chromosome I and chromosome II.

2.2.3.2 Longitudinal organisation of Chromosome I and II

We analysed the relative position within the cell of each loci for each cell size intervals (Figure 1C). To simplify the representation of the data, we chose to plot the median position of the loci, along with the 25/75 percentiles (error bars), in

oriented cells. The method used to orient the cell is described in detail in Text S1. In brief, we assumed that there was no gross rearrangement of chromosomal DNA after cell division so that any locus which was closer to the septum than to the pole in dividing cells had to be closer to the new pole in newborn cells. Time-lapse microscopy observations were used to confirm the validity of the method (Figure S2). Oriented plottings of all the raw data used in this work are shown in Figures S3 to S9.

In newborn cells, the relative cell positioning of *ori_I* was about 0.8 and of *ter_I* about 0.1 reflecting that *ori_I* is positioned near the old pole and *ter_I* close to the new pole. This is consistent with previously reported data on these loci [42,43]. The distance between *ori_I* positioning and any locus positioning on chromosome I correlated with the genetic distance, which suggested that the two arms of chromosome I were arranged longitudinally within the cell (Figure 1C). Direct measurement of the distance between any chromosome I locus and the *L3_I* focus in cells in which the two locus were tagged confirmed the longitudinal organisation of chromosome I (Figure S10). In respect to their position of duplication, two mode of segregation could be distinguished among chromosome I loci. The first mode of segregation was observed for loci located from *ori_I* to *L4_I* or *R4_I*. In this mode, loci remained at the relative positioning they occupied at cell birth until their duplication. As duplication occurred sequentially, the more genetically distant a locus was from the *ori_I*, the longer it remained "static" at its home position. It implies that the *ori_I*-*L4_I* and *ori_I*-*R4_I* chromosome regions "stretched out" with cell elongation. After duplication, sister foci were segregated to their home positions in the next cell size interval, suggesting that segregation might be a transient event within the cell cycle. The distances travelled by the two sister foci were not identical. The most unbalanced situation was observed for *ori_I* where one copy remained nearly immobile whereas the second crossed the whole cell length. On the contrary, the two *L3_I* sister loci exhibited symmetrical positioning compared to midcell/future new pole all along the cell cycle. The second mode of segregation applied to loci located in the terminus region of chromosome I, *R5_I*, *L5_I* and *ter_I*. In this mode, the relative positioning of the foci remained constant over 0.8 μ m and 1.2 μ m of cell elongation. Then, they migrated towards midcell within 0.4 μ m of cell elongation before their duplication. Despite its duplication profile, *L5_I* exhibits a Ter mode of segregation.

In newborn cells, *ori_{II}* positioned near midcell (relative position is 0.55) and *dif2* at 0.25 from the new pole, which was consistent with previous reports [10]. The relative positioning of *R_{II}* and *L_{II}* were intermediate between *ori_{II}* and *ter_{II}*, suggesting that chromosome II occupied only the younger half of the cell. Thus, chromosome II seems also to be organised longitudinally within the cell. Two modes of segregation could also be distinguished. The *ori_{II}* was maintained at midcell until duplication and then sister *ori_{II}* were repositioned to quarter positions in less than 0.4 μ m of cell elongation. The other loci *L_{II}*, *R_{II}* and *ter_{II}* appeared not to remain at a constant relative positioning from the *ori_{II}*. Therefore, the

unduplicated chromosome II, in contrast to the unduplicated chromosome I, could conserve a constant global volume during cell elongation.

2.2.3.3 Impact of *parS1* deletion on chromosome I organisation

Deletion of *parA1* results in the release of the *parS1* sites from the old pole, the relative position within the cell of ParB1 changing from 0.023 in wild-type context to 0.2 (Fogel and Waldor, 2006). Despite this dramatic change, no modification of cell fitness, cell cycle parameters were reported, suggesting that chromosome I segregation was not affected by the disruption of its *par* system. We wondered whether the organisation and segregation choreography of chromosome I could be globally modified due to this loss of *oriCI*-mobilization and anchoring. Thus, we visualized in cell deleted for its 3 *parS1* sites ($\Delta parS1$) a group of loci reflecting the global organization of chromosome I : *ori_I*, *R2_I*, *L3_I* and *ter_I*. The data were processed as in the previous section.

The longitudinal arrangement of chromosome I was maintained during the whole cell cycle as *ori_I* remained the closest loci to the old pole with a relative position of 0.7 in newborn cells; *R2_I* and *L3_I* loci remained colocalised during the whole cell cycle and positioned around midcell until their duplication. However, the position of these loci seemed wobblier, as if their home positions before and after duplication were less stringently controlled. Moreover, segregation of duplicated foci extended over a larger cell elongation interval compared to the wild-type context (around 0.6 μ m instead of 0.2 μ m). Time-lapse experiments confirmed the global behaviour of these three loci (data not shown). In contrast, the choreography and late duplication of *ter_I* was unmodified by the absence of the *parS1* sites. In conclusion, the impairment of the *par* system of chromosome I conferred a certain disorganization of the positioning and of the segregation steps of most of chromosome I. However, the global arrangement remained longitudinal, *ori_I* being more polar than the rest of the chromosome I.

2.2.3.4 Impact of *parS1* displacement on chromosome I organisation

We next wondered whether the displacement of *parS1* away from *oriCI* could modify the longitudinal arrangement of chromosome I. To this end, tandem *parS1* sites were introduced at 300kb, 490kb and 650kbp on the left arm of chromosome I in cells devoid of their three natural *parS1* sites. Displacing the location of the *par* system anchoring on chromosome I did not affect the fitness or the morphology of the cells. In addition, the functionality of the displaced *parS1* sites was not affected as judged by the visualisation of a minimum of one polar focus of ParB1-YpET in the vast majority of the different cell population (Figure S11).

Segregation still occurred in the order of the genetic map in the displaced cells (Figure 2). The positioning of *ter_I* was not significantly affected (Figure 2).

A mild effect was observed when *parS1* sites were displaced at 650kbp : *ter_I* was less polar and less precisely positioned before its final recruitment to midcell. However, reintroduction of *parS1* sites restored a more stable positioning of the other chromosomal loci. When the *parS1* sites were displaced to a location equidistant to *ori_I* and *L3_I*, (*parS1*300kb) these two sites occupied overlapping positioning in newborn cells and dividing cells at an equidistant position from their home positions in wild type cells. Their colocalisation was not permanent because their duplication occurred at different cell length. In addition, *R2_I* positioning was slightly shifted toward the new pole, as expected. As a consequence, *L3_I* and *R2_I* no longer co-localised. When the *parS1* sites were displaced at 650kbp (*parS1*650kb), at the *L3_I* locus, the home position of *ori_I* and *L2_I* were switched : the *ori_I* locus, which was now situated 700kbp away from the *parS1* sites, adopted the positioning of *L2_I* locus in the wild-type context when this locus is situated 700kbp away from the *parS1* sites. Reciprocally, *L2_I*, which was now at about 100kb from the *parS1* sites, exhibited a positioning similar to *ori_I* in the wild-type cell. The shift toward the new pole of the *R2_I* positioning was exacerbated as expected because it was now almost opposite of the *parS1* sites on the chromosome map.

To further clarify these chromosomal reorganisations, we took advantage of our double labelling systems to directly monitor their respective positions within dividing cells where *ori_I* and *L3_I* duplication and segregation were achieved. Thus, each half-cell contained one *ori_I* focus and one *L3_I* focus. We could compute the proportion of half-cells in which *ori_I* was more polar than *L3_I*, and reciprocally, in *parS1*_{65kb} (wild-type), *parS1*_{300kb}, *parS1*_{490kb} cells, and in Δ *parS1* cell (Figure 3). *ori_I* was more polar than *L3_I* in almost 100% of the cells in the wild type context (*parS1*_{65kb}). It gradually decreased to 60% when *parS1* sites are equidistant between *ori_I* and *L3_I* (*parS1*_{300kb}) and to 30% when *parS1* sites are closer to *L3_I* than to *ori_I* (*parS1*_{490kb}). These results showed that the sequential order originates from the *parS1* sites not only at the population level but also at the single cell level.

In conclusion, the displacement of *parS1* sites along the left chromosome I arm led to global rearrangement of chromosome I within the cell. These results suggest that the *par* system of chromosome I not only mobilises and anchors the *parS1* sites region at poles but also directly contributes to the arrangement of the entire DNA molecule. Only the positioning of the terminus region escaped the influence of the *par* system, presumably because of the *matS*/MatP system.

2.2.3.5 Impact of an extra *oriCI* at 650kb on chromosome I organisation

ori_I remained more polar than *L3_I* in ~80% of the cells in the absence of the *par* system (Figure 3), suggesting that other factors might contribute to its polar positioning. Initiation of replication was in itself a likely candidate. In order to test this possibility, we studied the impact of adding an extra origin of replication on the

Left arm of chromosome I, at 651kbp from its normal position in cells in which the *par* system was disrupted. The fitness of cells harbouring the two origins was not affected. Replication profiling demonstrated that the ectopic origin was as efficient as the normal one (Figure S12). Correspondingly, in *ori_I* and *L3_I* dually tagged cells, the synchrony of duplication was significantly improved by the ectopic origin (Figure S). However, earlier replication of the *ter_I* locus did not modify correspondingly its duplication ratio or its home position (Figure 4). *ter_I* reached its home position even at a later stage through an apparent less abrupt recruitment (Figure 4). Likewise, the positioning and the segregation of *ori_I* and *R2_I* loci were not significantly affected by the ectopic origin (Figure 4). However, the median position of *L3_I* seemed slightly shifted towards the old pole (Figure 4). Because the effect of the ectopic origin was barely detectable using the median, we decided to directly monitor in each cells which of the two competing locus, *ori_I* and *L3_I*, was the more polar. If the polar location of a locus was only dictated by the initiation of replication in its proximity, the proportion of cells in which *L3_I* was more polar than *ori_I* would reach 50%. Correspondingly, the polarity of *ori_I* compared to *L3_I* decreased from 80% in the parental cells (Δ *parS1*) to 55% in the cells harbouring an ectopic origin on the Left arm at 650kbp from *ori_I* (Figure 5). As a control, we checked that the polar location of *ori_I* compared to *R2_I* was unchanged by the ectopic origin on the Left arm, suggesting that the phenotype was not linked to a global disorganisation of the DNA within the cell (Figure 5). Thus, initiation of replication *per se* confers a polar positioning to its local neighbouring zone. Note, however, that the effect is masked by the presence of a *par* system (Figure S13). The contribution of the replication program should be more striking in cells containing a unique but displaced *oriC1* site but the presence of an *oriC1* site within the origin region turned out to be essential for cell viability (Figure S15).

2.2.4 Discussion

In this manuscript, we wished to determine the contribution of elements as *parS1* and *oriC1* sites in the longitudinal shaping of *V. cholerae* chromosome I.

The longitudinal organization of the chromosome I and II present different characteristics

We showed that both chromosome I and II adopt this longitudinal organisation with the *oriC* regions in the outer edges and the *ter* in the inner edges. The longitudinal organization of chromosome I is reminiscent to the one of *C. crescentus* one with both arms side by side from the old pole to the new one (Fig 6, WT). However, the stretching of the unduplicated part of the chromosome was rather described in the *E. coli* case. In addition, the relatively abrupt recruitment of the *ter_I* region to midcell is more reminiscent to the *E. coli* terminus choreography than to the *C. caulobacter* one. These resemblances might be correlated to the MatP/*matS* system conservation ([5], [6]). The choreography

of chromosome I would adopt a longitudinal *C. crescentus* model with the late and abrupt recruitment to midcell of the *E. coli* terminus. Data on chromosome II would also suggest a longitudinal organization with a choreography imposed by the active positioning of the *oriI* domain presumably via the structuration of the multiples *parS2* sites. The rest of the chromosome II appeared relatively passive, even the septum recruitment could not be observed despite the multiple *matS* sites (see positions of *parS2* and *matS* sites on Figure 1).

***parS1* sites displacement modify the longitudinal organisation but not the sequential segregation** We demonstrated that *parS1* sites are sufficient to the *oriC1-dif1* longitudinal shaping of the two *V. cholerae* chromosome I arms. The displacement of *parS1* sites nucleated a similar shaping from any ectopic position even at equidistance between *oriC1* and *dif1* (Figure 6, *parS1*650kb). Thus, *oriC1* is at the edge of this longitudinal organization due to its genomic proximity to the *parS1* sites (65kb apart) and independently of the replication program. Similar impact of *parS* sites on chromosome organization was already observed. Indeed, in *C. crescentus*, *parS* sites displacement led to the whole chromosome rotation [29]. However, in contrast to *C. crescentus*, the rotation of the chromosome I was only partial, as it did not include the *dif1*-terminus region. The maintenance of the *dif1* region at the extreme polar positioning could be due the conservation in *V. cholerae* and not in *C. crescentus* of the *matS*/MatP system ([42,43] reported to organise and anchor the terminus macrodomain at the septum in *E. coli* [7]). Thus, this partial rotation led to a longitudinal organization with one "*parS1-dif1* arm" being 3-times the genomic size of the second.

In *C. crescentus*, the *parS* sites were shown to be the first genomic elements to segregate [36] followed by the other loci in an order roughly corresponding to their genomic distances from the *parS* sites [28]. The duplication of a locus replicated 100kb earlier than the *parS* sites was not observed before *parS* sites duplication [36]. Thus, the global orientation of the *C. crescentus* chromosome would presumably follow the order of segregation, which follows the order of the genomic distance from *parS* sites independently of the replication program. In contrast, we showed that after *parS1* sites displacement the segregation of *V. cholerae* chromosome I was not correlated to the genomic order from *parS1* sites (Figure 2) but still followed the replication program. This could suggest that *parS1*-polar mobilisation is not essential to the segregation process but is involved only in the shaping of the segregated chromosome. This view is consistent with the fully efficient segregation of *V. cholerae* chromosome I lacking *parS1* sites.

The organisation of chromosome I is not converted from longitudinal to transversal upon *parS1* deletion The *parS1*-deleted-chromosome I conserved a longitudinal organization with the *oriC1* locus being the most polar locus (Fig. 6, $\Delta parS1$). In *C. crescentus*, the *parS* sites were also shown to nucleate a compact chromatin conformation over about 100kb, as moving these elements elsewhere in the genome condenses the regions moved away [29]. It could be due to the ParB-dependant recruitment of SMC, DNA condensing proteins, to *parS* sites, previously reported in *B. subtilis* and in *S. pneumoniae*. Interestingly, the recruitment of SMC proteins to the origin region via *parS* sites or not (as in *E. coli*) was shown to participate in chromosome segregation ([21,22,37]). In *V. cholerae*, we could speculate that the longitudinal shaping could be nucleated from the *parS1* sites due to the recruitment of MukB, SMC-like proteins, condensing DNA in a lengthwise manner. In addition, the *parS1* sites could facilitate the segregation process independently of a ParAI-mediated active transport but through the condensation of the origin region. Accordingly, the loss of these "condensation sites" could explain the disorganization (wobbly positioning) and the extension of the *oriC1* segregation step observed for the *parS1*-deleted-chromosome I. This disorganization could also be explained by the loss of polar anchoring. Moreover, the loss of "condensation sites" could explain that the global organization of $\Delta parS1$ chromosome is not converted from longitudinal to transversal as in *E. coli* (Fig. 6, crossed drawing). Indeed, in *E. coli* $\Delta mukB$ cells the chromosome organization was converted from transversal to longitudinal [37]. However, we could also hypothesised that the action of MukB on the origin region could be weaker in *V. cholerae* than in *E. coli* as *mukB* gene is essential in fast growth conditions in *E. coli* [42,43]) whereas no phenotype could be detected in *V. cholerae* (Possoz and Barre, unpublished results).

Contribution of the replication program is masked by other factor actions We showed that this *parS1*-independent organization was shaped by the replication program. The positioning of a mid-arm locus became more polar when it is reprogrammed to replicate very early due to the proximal introduction of a replication origin (*oriC1*). In *E. coli* or in *B. subtilis*, the modification of the replication program by addition or displacement of *oriC* site did not modify the global chromosome organization [39,40] . However, the impact of the *oriC* site was only tested in an otherwise wild-type context whereas in *V. cholerae* it was revealed exclusively in a *parABS1* mutant context. Thus, the impact of replication precocity could also be masked in these other organisms by other contributing system as the origin condensation via SMC/MukB recruitment. Nevertheless, even if replication initiation from a mid-right arm *oriC* (called *oriZ* in [39]) did not affect the *left-right* *E. coli* chromosome organization, it increased the *right-left-left-right* arrangement of the two sister chromosomes where both sister *oriZ* were polar. Thus, in *E. coli*,

the replication precocity could contribute to a polar mobilisation. Moreover, in *E. coli mukB* mutant cells or upon the rapid depletion of MukE proteins, the chromosome had lost its *left-right* organization and adopted a longitudinal organization with polar *oriC* region ([37,41]). Similarly as in *V. cholerae* *par* mutant, the *oriC* impact could be revealed in an *E. coli muk* mutant.

From this report, we could reveal that *parS1* and *oriC1* sites, acting near or at the replication origin, shape the bacterial chromosome. The highly conserved genetic proximity between these two *cis*-acting sites was proposed to be linked to the role of *parS1* sites on origin mobilisation or on replication initiation regulation [11]. Revealing the impact of *oriC1* on polar mobilisation, the *parS1* sites could have been selected at its proximity in order that the two polar contributions would be convergent.

2.2.5 Material and Methods

2.2.5.1 Strains and Plasmids

Bacterial strains and plasmids used in this study are all listed in Tables S1 and S2 respectively. All *V. cholerae* mutants were constructed by integration-excision or natural transformation (Protocols and details on the construction of each strain in Text S1). To this end, a derivative of the El Tor *V. cholerae* N16961 was rendered competent by the insertion of *hapR* by specific transposition [42]. Engineered strains were confirmed by PCR.

2.2.5.2 Fluorescence Microscopy

Cells were observed in Minimal Media to have only a single copy of each chromosome after division. Protocols for Microscopy are detailed in Text S1. The snapshot images were analysed using the Matlab-based software MicrobeTracker [43], see details for the analysis in Text S1.

2.2.6 Acknowledgments

We wish to thank I. Vallet-Gely for sharing Matlab functions and M. Blokesch and E. Galli for *V. cholerae* chromosomal engineering tools. We would like to acknowledge financial support from the Agence Nationale pour la Recherche [ANR-09-BLAN-0258] and from the European Research Council under the European Community's Seventh Framework Programme [FP7/2007-2013 Grant Agreement no. 281590]. A.D. was a recipient of a CNRS/DGA PhD fellowship.

2.2.7 References

1. Kuempel PL, Henson JM, Dircks L, Tecklenburg M, Lim DF (1991) dif, a recA-independent recombination site in the terminus region of the chromosome of *Escherichia coli*. *New Biol* 3 : 799-811.
2. Possoz C, Junier I, Espeli O (2012) Bacterial chromosome segregation. *Front Biosci (Landmark Ed)* 17 : 1020-1034.
3. Vallet-Gely I, Boccard F (2013) Chromosomal organization and segregation in *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS Genet* 9 : e1003492.
4. 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.
5. Brezellec P, Hoebeke M, Hiet MS, Pasek S, Ferat JL (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.
6. Mercier R, Petit MA, Schbath S, Robin S, El Karoui M, et al. (2008) The MatP/matS site-specific system organizes the terminus region of the *E. coli* chromosome into a macrodomain. *Cell* 135 : 475-485.
7. Espeli O, Borne R, Dupaigne P, Thiel A, Gigant E, et al. (2012) A MatP-divisome

interaction coordinates chromosome segregation with cell division in *E. coli*. *EMBO J* 31 : 3198-3211.

8. Srivastava P, Fekete RA, Chattoraj DK (2006) Segregation of the replication terminus of the two *Vibrio cholerae* chromosomes. *J Bacteriol* 188 : 1060-1070.
9. Fiebig A, Keren K, Theriot JA (2006) Fine-scale time-lapse analysis of the biphasic, dynamic behaviour of the two *Vibrio cholerae* chromosomes. *Mol Microbiol* 60 : 1164-1178.
10. Fogel MA, Waldor MK (2006) A dynamic, mitotic-like mechanism for bacterial chromosome segregation. *Genes Dev* 20 : 3269-3282.
11. Livny J, Yamaichi Y, Waldor MK (2007) Distribution of centromere-like *parS* sites in bacteria : insights from comparative genomics. *J Bacteriol* 189 : 8693-8703.
12. Salje J, Gayathri P, Lowe J (2010) The ParMRC system : molecular mechanisms of plasmid segregation by actin-like filaments. *Nat Rev Microbiol* 8 : 683-692.
13. Ringgaard S, van Zon J, Howard M, Gerdes K (2009) Movement and equipositioning of plasmids by ParA filament disassembly. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106 : 19369-19374.
14. Thanbichler M, Shapiro L (2006) MipZ, a spatial regulator coordinating chromosome segregation with cell division in *Caulobacter*. *Cell* 126 : 147-162.
15. Yamaichi Y, Fogel MA, Waldor MK (2007) *par* genes and the pathology of chromosome loss in *Vibrio cholerae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104 : 630-635.
16. Lee MJ, Liu CH, Wang SY, Huang CT, Huang H (2006) Characterization of the *Soj/Spo0J* chromosome segregation proteins and identification of putative *parS* sequences in *Helicobacter pylori*. *Biochem Biophys Res Commun* 342 : 744-750.
17. 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.
18. Yamaichi Y, Fogel MA, McLeod SM, Hui MP, Waldor MK (2007) Distinct centromere-like *parS* sites on the two chromosomes of *Vibrio* spp. *J Bacteriol* 189 : 5314-5324.
19. Murray H, Errington J (2008) Dynamic control of the DNA replication initiation protein DnaA by *Soj/ParA*. *Cell* 135 : 74-84.
20. Kadoya R, Baek JH, Sarker A, Chattoraj DK (2011) Participation of chromosome segregation protein ParAI of *Vibrio cholerae* in chromosome replication. *J Bacteriol* 193 : 1504-1514.
21. Gruber S, Errington J (2009) Recruitment of condensin to replication origin regions by ParB/*Spo0J* promotes chromosome segregation in *B. subtilis*. *Cell* 137 : 685-696.
22. 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.
23. Ptacin JL, Lee SF, Garner EC, Toro E, Eckart M, et al. (2010) A spindle-like apparatus guides bacterial chromosome segregation. *Nat Cell Biol* 12 : 791-798.
24. Schofield WB, Lim HC, Jacobs-Wagner C (2010) Cell cycle coordination and regulation of bacterial chromosome segregation dynamics by polarly localized pro-

teins. EMBO J 29 : 3068-3081.

25. Shebelut CW, Guberman JM, van Teeffelen S, Yakhnina AA, Gitai Z (2010) Caulobacter chromosome segregation is an ordered multistep process. Proc Natl Acad Sci U S A 107 : 14194-14198.

26. 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.

27. Laloux G, Jacobs-Wagner C (2013) Spatiotemporal control of PopZ localization through cell cycle-coupled multimerization. J Cell Biol 201 : 827-841.

28. Viollier PH, Thanbichler M, McGrath PT, West L, Meewan M, et al. (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.

29. 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.

30. Fogel MA, Waldor MK (2005) Distinct segregation dynamics of the two *Vibrio cholerae* chromosomes. Mol Microbiol 55 : 125-136.

31. Kahng LS, Shapiro L (2003) Polar localization of replicon origins in the multipartite genomes of *Agrobacterium tumefaciens* and *Sinorhizobium meliloti*. J Bacteriol 185 : 3384-3391.

32. Wang X, Liu X, Possoz C, Sherratt DJ (2006) The two *Escherichia coli* chromosome arms locate to separate cell halves. Genes Dev 20 : 1727-1731.

33. Nielsen HJ, Ottesen JR, Youngren B, Austin SJ, Hansen FG (2006) The *Escherichia coli* chromosome is organized with the left and right chromosome arms in separate cell halves. Mol Microbiol 62 : 331-338.

34. Val ME, Kennedy SP, El Karoui M, Bonne L, Chevalier F, et al. (2008) FtsK-dependent dimer resolution on multiple chromosomes in the pathogen *Vibrio cholerae*. PLoS Genet 4 : e1000201.

35. Rasmussen T, Jensen RB, Skovgaard O (2007) The two chromosomes of *Vibrio cholerae* are initiated at different time points in the cell cycle. EMBO J 26 : 3124-3131.

36. 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.

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

38. Niki H, Jaffe A, Imamura R, Ogura T, Hiraga S (1991) The new gene *mukB* codes for a 177 kd protein with coiled-coil domains involved in chromosome partitioning of *E. coli*. EMBO J 10 : 183-193.

39. Wang X, Lesterlin C, Reyes-Lamothe R, Ball G, Sherratt DJ (2011) Replication and segregation of an *Escherichia coli* chromosome with two replication origins. Proc Natl Acad Sci U S A 108 : E243-250.

40. Berkmen MB, Grossman AD (2007) Subcellular positioning of the origin region of the *Bacillus subtilis* chromosome is independent of sequences within *oriC*, the site of replication initiation, and the replication initiator DnaA. *Mol Microbiol* 63 : 150-165.
41. Badrinarayanan A, Lesterlin C, Reyes-Lamothe R, Sherratt D (2012) The *Escherichia coli* SMC complex, MukBEF, shapes nucleoid organization independently of DNA replication. *J Bacteriol* 194 : 4669-4676.
42. Marvig RL, Blokesch M Natural transformation of *Vibrio cholerae* as a tool--optimizing the procedure. *BMC Microbiol* 10 : 155.
43. Sliusarenko O, Heinritz J, Emonet T, Jacobs-Wagner C High-throughput, sub-pixel precision analysis of bacterial morphogenesis and intracellular spatio-temporal dynamics. *Mol Microbiol* 80 : 612-627.

2.2.8 Figures

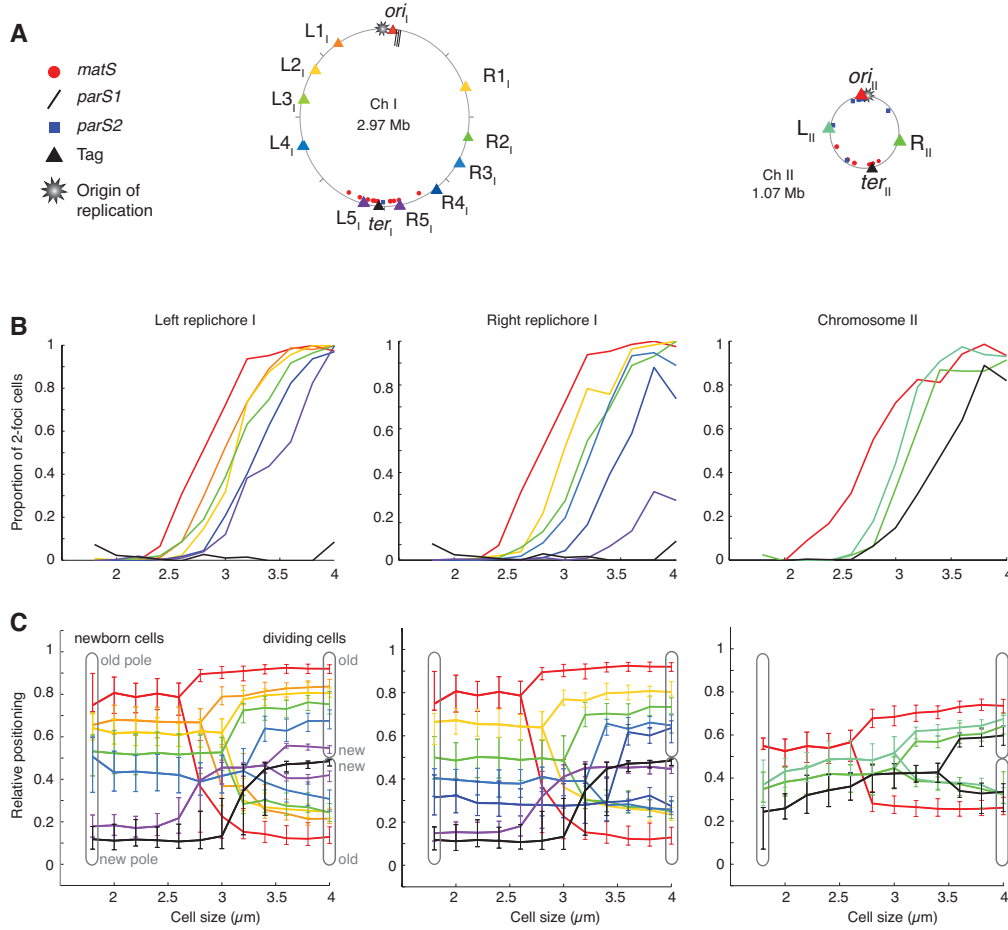


FIGURE 2.1 – Longitudinal organization of *V. cholerae* chromosomes I and II : sequential duplication and segregation : A : Circular *V. cholerae* chromosome I and II maps indicating the position of the different tags (colour code allows tag recognition in **B** and **C**) with respect to *oriC1*, *parS1*, *parS2* and *matS* sites. **B :** Proportion of 2 foci cells according to cell length for the different loci (color code from **A**) of the left replicore I, the right replicore I and the chromosome II in the left, middle and right panels, respectively. **C :** Reconstitution of the segregation choreographies of loci (color coded in **A**) of the left replicore I, the right replicore I and the chromosome II in the left, middle and right panels, respectively. The median, the 25th and the 75th percentiles of the relative cell positioning of each loci are represented in each cell length interval. The cells falling into the first cell length interval were named newborn cells and the one falling into the last interval were named dividing cells, represented by the grey outlines. Positioning is oriented from the new pole (0) to the old pole (1)

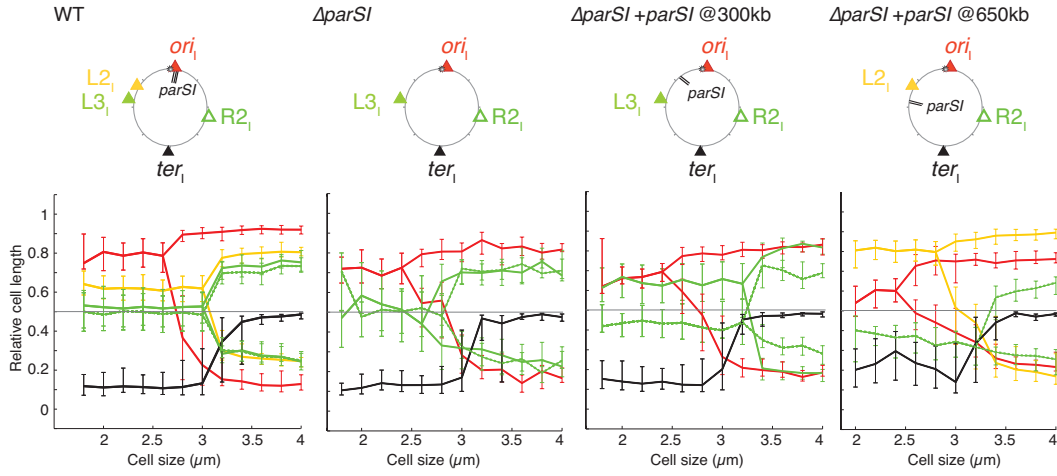


FIGURE 2.2 – **Reorganization of chromosome I upon *parS1* deletion and displacement** : The cell positioning of the loci analysed in different genetic background (WT, $\Delta parS1$, *parS1*_{300kb} and *parS1*_{650kb} from left to right, respectively) are shown below the circular map indicating the position of the tags (colour code allowing tag recognition) and the position of the *parS1* sites.

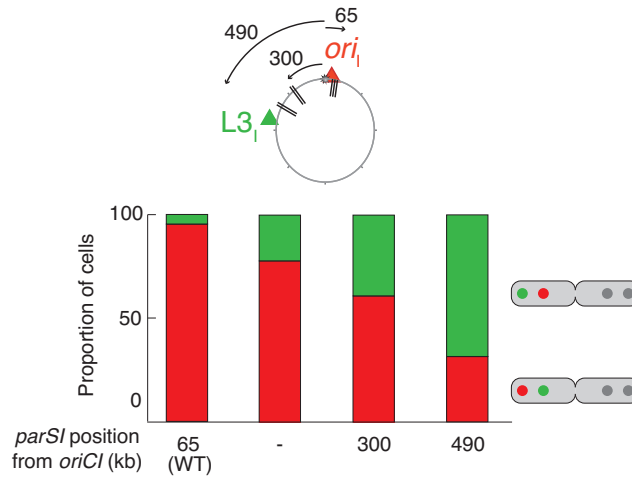


FIGURE 2.3 – **Increase of *L3I* polarity over *oriI* upon *parS1* displacement toward *L3I* locus** : For each pole of WT, $\Delta parS1$, *parS1*_{300kb} and *parS1*_{490kb} dividing cells (about the 100 longest cells), the most polar locus between *oriI* and *L3I* is determined. The red part of the stacked histogram represents the proportion of case with *oriI* more polar than *L3I*, whereas the green part represents the opposite

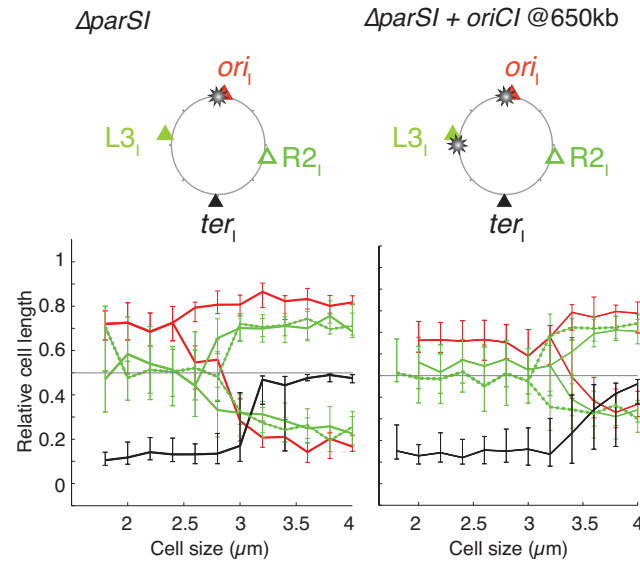


FIGURE 2.4 – **Mild reorganization of chromosome I upon the ectopic *oriCI*_{651kb} addition** : The cell positioning of the loci analysed in different genetic background (WT, *oriCI*_{651kb} from left to right, respectively) are shown below the circular map indicating the position of these tags (colour code allowing tag recognition) and of the *oriCI* sites

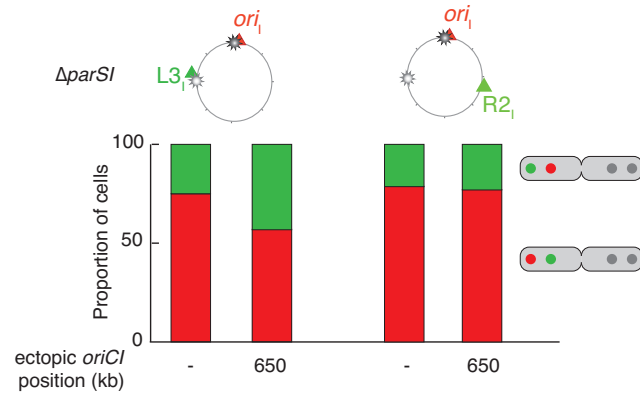


FIGURE 2.5 – **Increase of L3_I polarity over ori_I upon *oriCI* addition near L3_I locus** : For each pole of WT and *oriCI*_{651kb} dividing cells (about the 100 longest cells), the most polar locus between ori_I and L3_I (left two histograms) and between ori_I and R2_I (right two histograms) were determined. The red part of the stacked histogram represents the proportion of case with ori_I more polar than L3_I or R2_I, whereas the green part represents the opposite

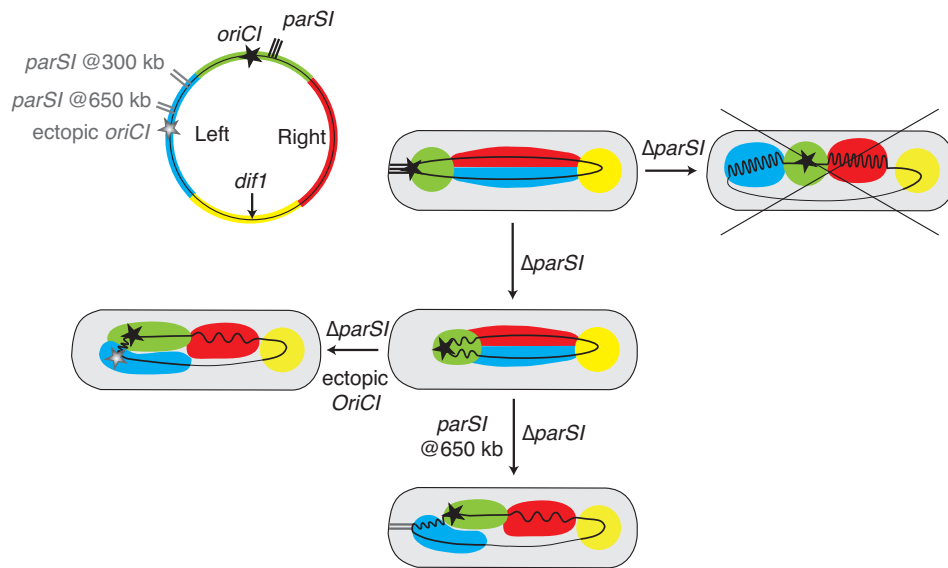


FIGURE 2.6 – **Models of chromosome I organization and reorganizations by *parS1* and *oriC1* actions** : The chromosome I was divided in 4 regions : Ori in green, Left in blue, Right in Red and Ter in Yellow (circular map). In the WT context, the Ori and the Ter are attached to the old pole and new pole, respectively. The Left and Right are laying in between. In the $\Delta parS1$ context, the longitudinal organization is maintained but the Ori is detached from the pole. The loss of *parS1* sites do not convert the organization of chromosome I to a transversal type as in *E. coli* (crossed drawing). In the *parS1*_{650kb} context, the Left becomes more polar than the Ori region. The Right is restricted toward the new pole where the Ter remains anchored. In the *oriC1*_{651kb} context, the Left becomes as polar as the Ori without modifying significantly the Right and the Ter

2.2.9 Supplementary Materials, TextS1

Construction of *V. cholerae* strains See also Table S1. Marker Frequency Analysis done by deep sequencing revealed the inversion between two *rrn* operons separated by a region of about 150kb containing the origin around 30kb on one side. On the maps, the different tags were positioned with respect to this inversion, but in the table the coordinates of the tags were kept with respect to the N16961 GenBank sequence. Genes coding for fusion proteins LacImcherry and yGFP-ParB_{pMT1} were introduced by integration-excision at the *lacZ* locus under the *E. coli lacZ* promoter, using plasmid pAD19.

A library of the N16961 *V. cholerae* strain was built using a mariner transposon to integrate the *tetR* gene using tetracyclin resistance as a selection. The insertion was mapped in 100 of the clones by direct sequencing of the DNA flanking the point of insertion by arbitrary-random PCR [1]. Out of this collection, we chose clones in which the *tetR* insertions occurred outside an open reading frame and outside an obvious promoter. These insertions were checked by PCR and their unicity by southern blot. While *tetR* conferred sufficient resistance for the construction of the library, it failed as a selective marker for natural transformation. Therefore, we inserted the *zeo* gene within the *tetR* sequence of each of the clones of interest of our library using pGD162. Resistance to zeocin could then be used to recover the positions into ADV7 by natural transformation. Positions we could not obtain by transposition were engineered by building a plasmid with *tet-zeo-tet* between homologies of the zone of interest and adding the position by natural transformation. The *zeo* gene was then replaced by a LacO array associated with a Kanamycin resistance by natural transformation of plasmid pAD20 or by parS_{pMT1} sites associated with Chloramphenicol resistance by natural transformation of the plasmid pAD39.

Δ *parSI* strains were made by natural transformation of plasmid pPOS169. New *parSI* sites at 300 and 490 kb from *oriCI* were inserted by natural transformation of plasmid pPOS184 or for the position at 650 kb from *oriCI*, by natural transformation of plasmid pPOS185. The ectopic *oriCI* was added by natural transformation of plasmid pPOS228.

See plasmids in Table S2.

Deletion of *oriCI* After introducing an ectopic *oriCI* using natural transformation with pPOS228, we attempted to delete the original Origin of replication of the chromosome I. Two strategies were performed : a direct deletion by replacing the *oriCI* with a *Rif* resistance gene or an indirect deletion, by first replacing *oriCI* by an *oriCI* flanked by FRT sites and secondly deleting it by inducing a Flipase protein (pFLP2, [2]). (See Figure S15)

When the second *oriCI* was introduced in the middle of the replicore (near L3I locus), we were unable to delete the original *oriCI*, even though it was possible to replace it by a FRT-*oriCI*-FRT. It was however possible to delete this Origin when the second *oriCI* was at only 50 kb from it.

Natural transformation Receiving strains were streaked on LB-agar plates supplemented with antibiotics and left to grow at 37 ° C overnight. A preculture on 5mL of LB + antibiotics was then started for each strain, until OD ~ 0.6 . 1mL of culture was centrifugated at 5000rpm during 10 min, and the pellet was resuspended in the same volume of M9 media. Chitine flakes were inoculated with 1mL of washed cells and 1mL of fresh M9 media and left at 30 ° C overnight. The next day, the biofilms were centrifugated at 5000rpm during 10min. Supernatant is removed and replaced by 1mL of fresh M9. The DNA containing the mutation to insert on the genome of the receiving strain is added to the biofilm which is left at 30 ° C during 3h to overnight. The biofilm is vortexed and different concentrations of supernatant are plated on LB-agar + antibiotics.

Microscopy Cells were first grown in 5 ml LB media supplemented with antibiotics at 37 ° C until a density of ~ 0.6 OD600 units, then diluted 1/100 in 5 ml M9 media and grown at 37 ° C until a density of [F0BB ?] 0.6 OD600 units. The cultures are then diluted 1/1000 in 5 ml M9 media for an overnight growth at 25 ° C. The next day, the cultures were diluted $\frac{1}{4}$ times in 5 ml M9 media and grown at 37 ° C, until a density of ~0.2 OD600 units.

For snapshots, an agar pad (1% in M9) was cast on a slide. 4 μ L of cell culture was allowed to adsorb onto the pad before addition of a coverslip. Cells were visualised using a DM6000-B(Leica) microscope.

For images of timelapse, a Geneframe (Thermo Scientific) was glued on a slide, and a thin pad of agarose (1% in M9) was cast into the Geneframe. After polymerisation, a 3mm large part of the pad was cut in the middle to create a chamber allowing renewal of oxygen in the pad. 4 μ L of cell culture was allowed to adsorb onto the pad before addition of a coverslip. Cells were visualized with a microscope Axio Observer (Zeiss) coupled with a CSU 1x Spinning Disk, a 491 laser illumination line and a EVOLVE 512 EM-CCD camera (Roper scientific) at a constant temperature of 30 ° C. Images were analysed using the Metamorph software.

Informatic Analysis

Orientation of the cells The pole generated by the last division is called the new pole and the other is called the old pole. The two poles orient a cell. The orientation of cells containing two sister foci was arbitrarily imposed such that the closest pole to a focus is defined as the old pole. In cells containing a unique focus, the closest pole to a focus is either the old or the new pole depending on the position of this locus in the dividing cells (e.g as in dividing cells, *oriI* foci were closer to poles than to midcell, *oriI* was oriented toward the old pole in one-focus-cells; in contrast, as sister L4I foci were close to midcell before division, L4I was oriented toward the new pole in one-focus-cells). In the case of L3I, as the duplicated foci localise at intermediate distance from poles to midcell, polarity was imposed by a second fluorescent labelling system integrated either at *oriI* or at *terI*. However, the

choreographies of L3I realised using these two orientations or without any orientation were similar suggesting a central positioning of L3I before duplication followed by a symmetrical positioning of the duplicated foci reaching the quarter positions in dividing cells.

When either *terI* or *oriI* tag were present, it was used to orient the cells for the two tagged loci. The way each cell was oriented is indicated beside its raw data in fig. S3 to S9

Representation of the data For each size interval subpopulation, we represent the median of the relative positioning and their 25/75 percentiles (error bars). It ranged between 0 (new pole) to 1 (old pole).

Most of the loci duplicated before division but the switch from a one-focus-cell population to a two-foci-cell population occurred over 0.4 to 0.6 μm cell elongation (2 to 3 cell size intervals). To facilitate visualisation, only the one-focus-subpopulation was represented as long as it corresponds to more than 50% of the population. Then, until cell division, only the 2 foci cell subpopulation was represented. Thus, during the whole "cell cycle" only one focus cells were represented for the late duplication loci located around *terI*.

2.2.10 Supplementary References

(1) : O'Toole GA, Kolter R (1998) Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signalling pathways : a genetic analysis. *Mol Microbiol* 28 : 449-461

(2) : 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* 28 : 77-86

2.2.11 Supplementary Tables

Table S1
Vibrio cholerae strains

chl		All strains derived from ADV7 : N16961 hapR+, lacZ ::(LacI-mCherry . yGFP-parBT1)						
Locus position	Labelling system	wt	Δ <i>parS1</i>	Δ <i>parS1</i> + 2 <i>parS1</i> @300kb	Δ <i>parS1</i> + 2 <i>parS1</i> @490kb	Δ <i>parS1</i> + 2 <i>parS1</i> @ 650kb	Ori@ 651kb	Δ <i>parS1</i> + ori651kb
OriI (53 355 bp)	<i>parST1</i> <i>lacO</i>	ADV78 ADV24, ADV123	CP599,CP655 CP568	CP604 CP591	CP634	CP605 CP592	CP633	CP659, CP656 CP626
R1I (2 501 730 bp)	<i>lacO</i>	ADV23						
R2I (2 236 849 bp)	<i>lacO</i>	ADV25	CP636, CP655	CP582		CP583		
R3I (2 087 902 bp)	<i>lacO</i>	ADV21						CP656
R4I (1 897 627 bp)	<i>lacO</i>	ADV33						
R5I (1 685 991 bp)	<i>lacO</i>	ADV51						
TerI (1 564 103 bp)	<i>lacO</i> <i>tetO</i>	ADV78	CP599,CP484 CP639	CP604		CP605		CP659
L1I (426 568 bp)	<i>lacO</i>	ADV22						
L2I (612 484 bp)	<i>lacO</i>	ADV20	ADV39			CP586		
L3I (774 401 bp)	<i>parST1</i>	ADV24	CP568,CP639	Cp591 CP582	CP634		CP633	CP626
L4I (1 023 452 bp)		EPV213						
L5I (1 461 502 bp)	<i>lacO</i>	ADV50						
chlI								
OriII (1 048 462 bp)	<i>lacO</i>	ADV64						
LII (0.821 Mb)	<i>parST1</i>	ADV123						
RII (0.312 Mb)	<i>parST1</i>	ADV30						
TerII (497 861 bp)	<i>lacO</i> <i>parST1</i>	ADV30 ADV64						

FIGURE 2.7 – Table S1

Table S2
Table of Plasmids

Name	Genotype	Reference
pGD162	integration-excision vector ; <i>sacB</i> ; ori R6K ; Tet'-zeo-'Tet cassette ; CmR, ZeoR	This study
pAD19	integration-excision vector ; <i>sacB</i> ; ori R6K ; YGFP-ParBT1 and LacI-mcherry between Up- and Downstream regions of <i>V.cholerae</i> <i>LacZ</i> gene ; CmR	This study
pAD20	integration-excision vector ; <i>sacB</i> ; ori R6K ; LacO array + KanR between TetR homologies ; CmR, Kan	This study
pAD22	integration-excision vector ; <i>sacB</i> ; Tet-Zeo-Tet cassette between homologies around LII ; CmR, ZeoR	This study
pAD23	integration-excision vector ; <i>sacB</i> ; ori R6K ; Upstream of dif1 - dif1 - Tet'-zeo-'Tet - Downstream of dif1 ; CmR, ZeoR, AmpR	This study
pAD24	integration-excision vector ; <i>sacB</i> ; ori R6K ; Upstream of dif1 - no dif1 - Tet'-zeo-'Tet - Downstream of dif1 ; CmR, ZeoR, AmpR	This study
pAD25	integration-excision vector ; <i>sacB</i> ; ori R6K ; Tet'-zeo-'tet cassette between Up and Down homology zones on the right of dif1 at 1,68 Mb (1685991 bp) ; genes clockwise ; CmR, ZeoR	This study
pAD30b	pUC vector ; Upstream of dif2 - dif2 - Tet'-zeo-'Tet - Downstream of dif2 ; ZeoR, AmpR	This study
pAD31a	pUC vector ; Upstream of dif2 - no dif2 - Tet'-zeo-'Tet - Downstream of dif2 ; ZeoR, AmpR	This study
pAD39	integration excision vector ; <i>sacB</i> ; ori R6K ; Tet'-parST1- FRT-CmR-FRT-'Tet ; CmR	This study
pPOS169	integration excision vector ; <i>sacB</i> ; ori R6K ; Δ parSI :: Spec	This study
pPOS184	integration-excision vector ; <i>sacB</i> ; ori R6K ; <i>parSI</i> -FRT-Rif-FRT- <i>parSI</i> between TetR homologies ; CmR, Rif	This study
pPOS185	integration-excision vector ; <i>sacB</i> ; ori R6K ; <i>parSI</i> -FRT-Rif-FRT- <i>parSI</i> between homologies around L3I ; CmR, Rif	This study
pPOS228	pUC vector ; oriC-zeoR between homology zones around L3I ; AmpR, zeoR	This study

FIGURE 2.8 – Table S2

2.2.12 Supplementary Figures

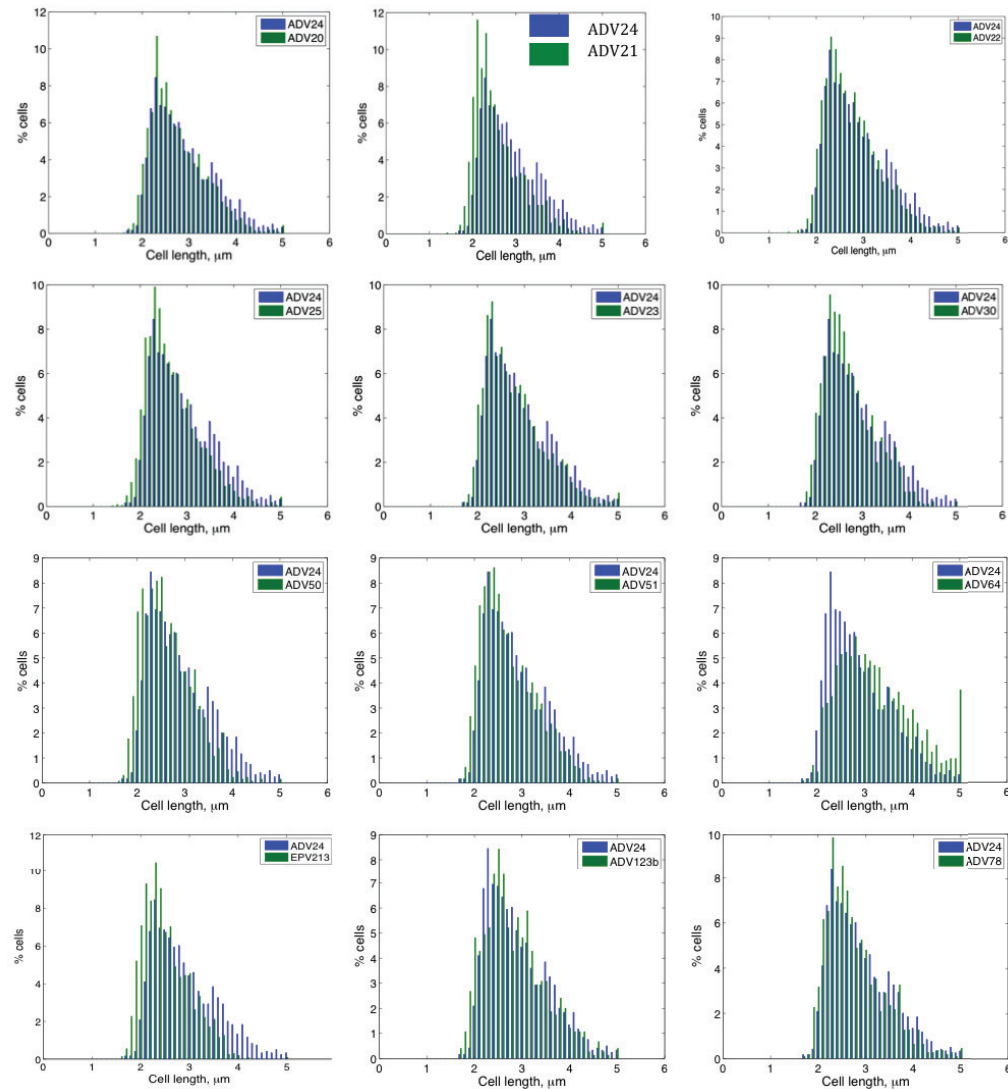
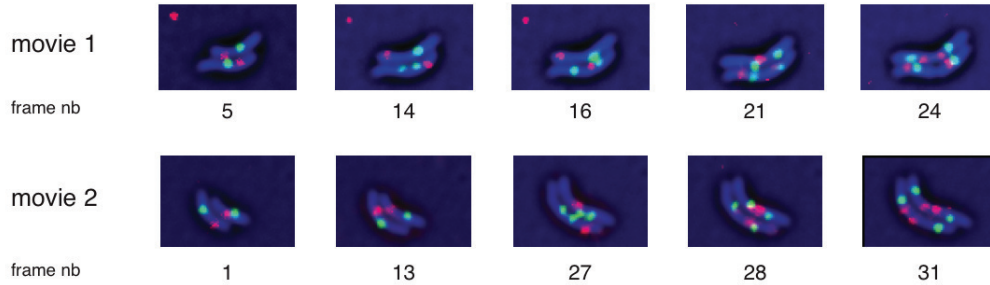


FIGURE 2.9 – Figure S1 : Homogenous cell size distribution of the different strain studied : They are all plotted against ADV24 (*ori_I* and *L3_I*) as reference. See Table S1 for the labelling of each strain.

ADV21 ($R3_I$ (lacI-mcherry) + $L3_I$ (yGFP- $\Delta 30$ ParB_{pMT1})) :



ADV23 ($R1_I$ (lacI-mcherry) + $L3_I$ (yGFP- $\Delta 30$ ParB_{pMT1})) :

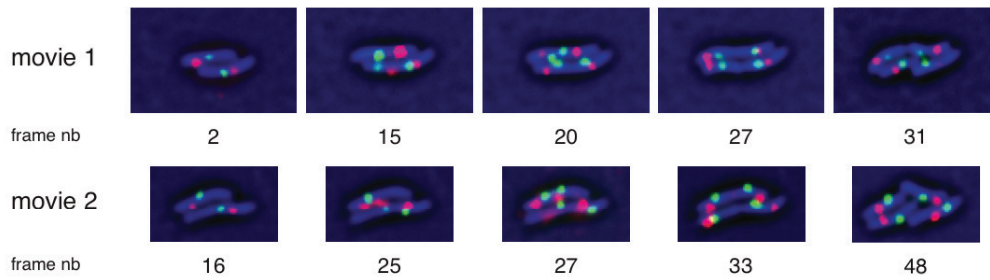


FIGURE 2.10 – **Figure S2 : Timelapse ADV21 and ADV23** : Acquisition was every 5 min and only timepoints of interest are shown. Green foci correspond to yGFP-ParBpMT1 and red foci to LacI-mCherry

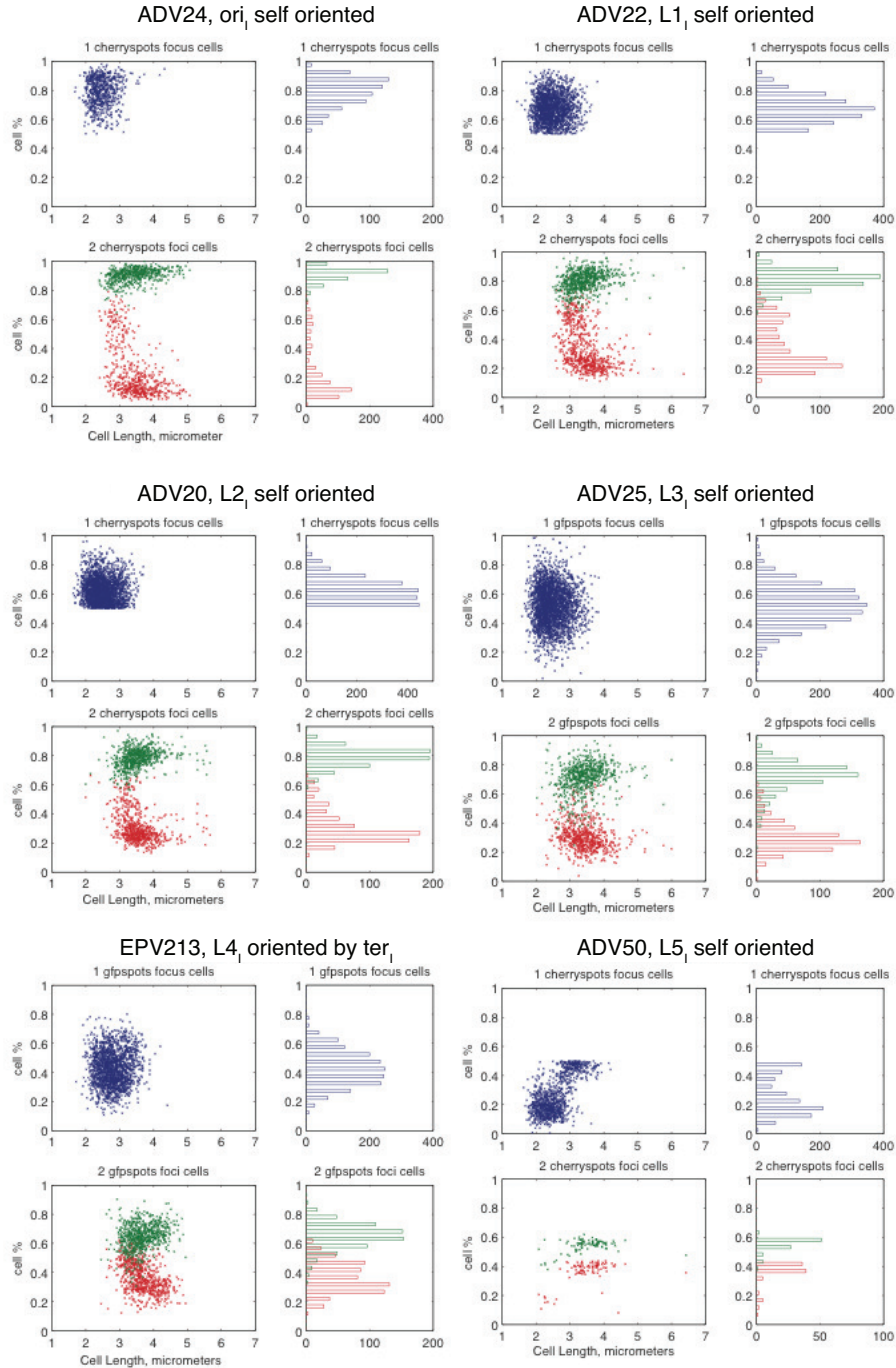


FIGURE 2.11 – **Figure S3 : Raw Data for loci on the replicore Left and *oriI* :** Raw data used for reconstruction of all the segregation choreographies presented. For each strain, the cell orientation is indicated. 4 panels present each locus positioning : the one-focus cells data (blue) on the upper panels and the two-foci cells data (red and green) on the lower panels. The relative positioning according to cell size (dot plot) are shown on the left panels and the proportion of cells presenting each relative cell positioning (histograms) on the right panels

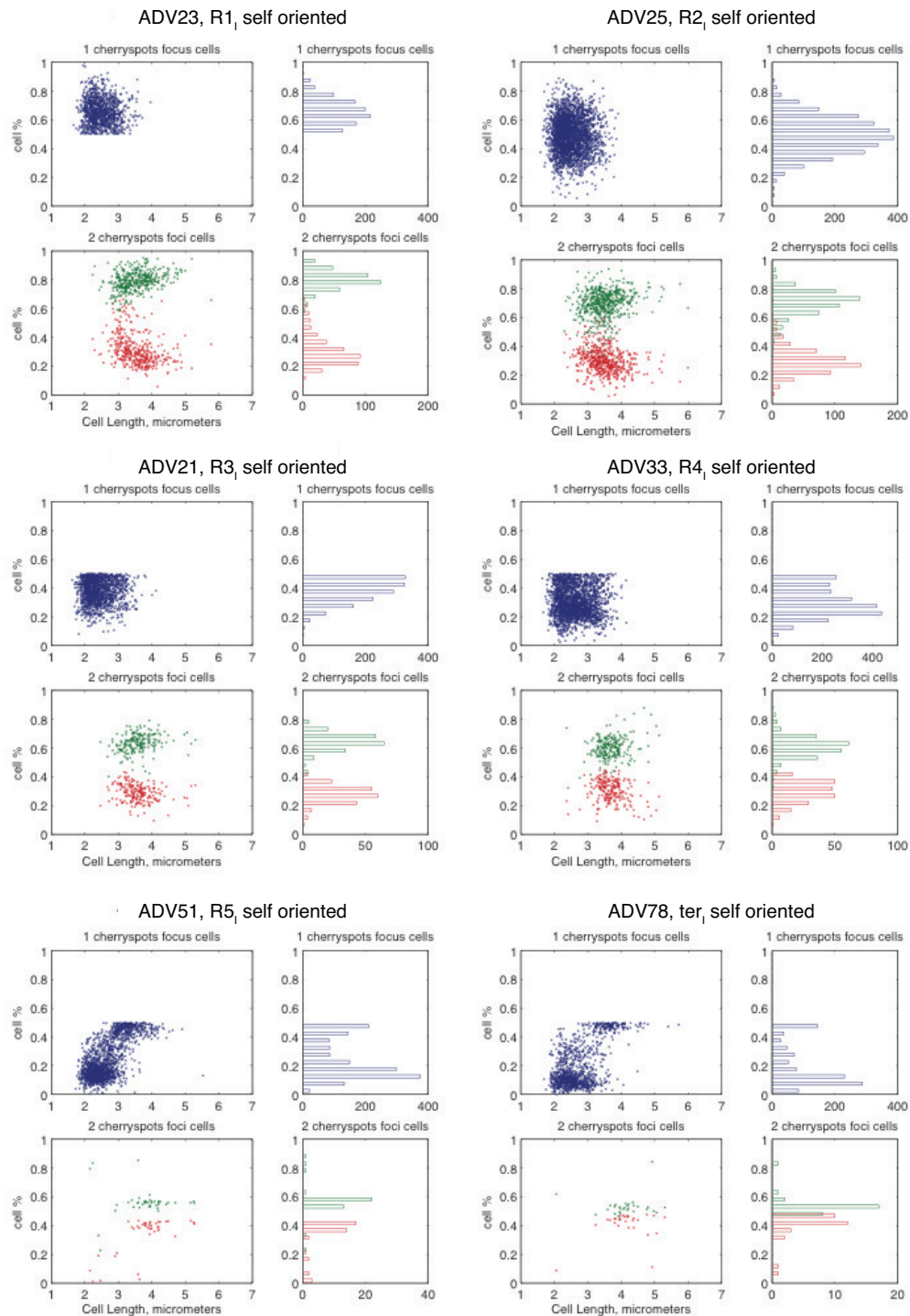


FIGURE 2.12 – Figure S4 : Raw Data for loci on the replicore Right and *ter_I* : see legend in Figure S3

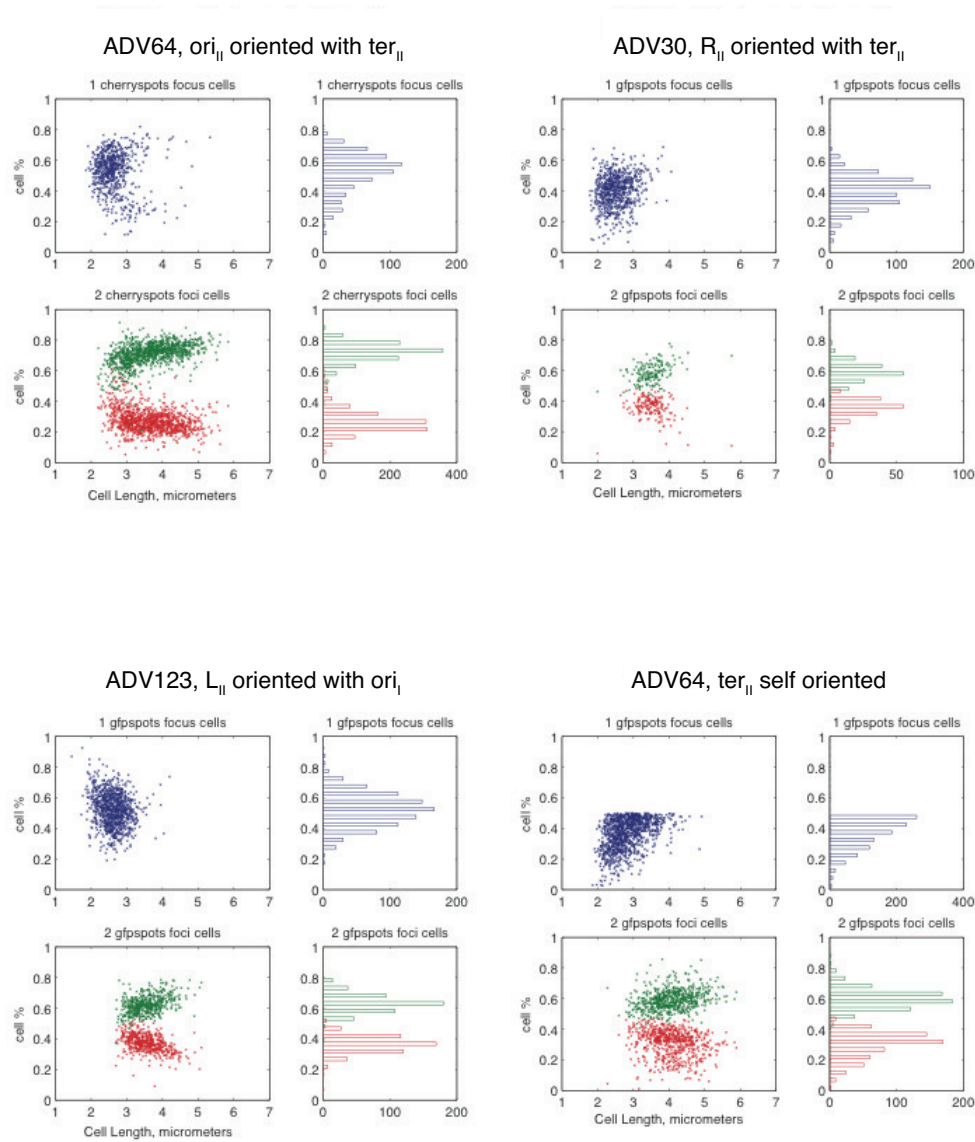


FIGURE 2.13 – Figure S5 : Raw Data for loci on chromosome II : see legend in Figure S3

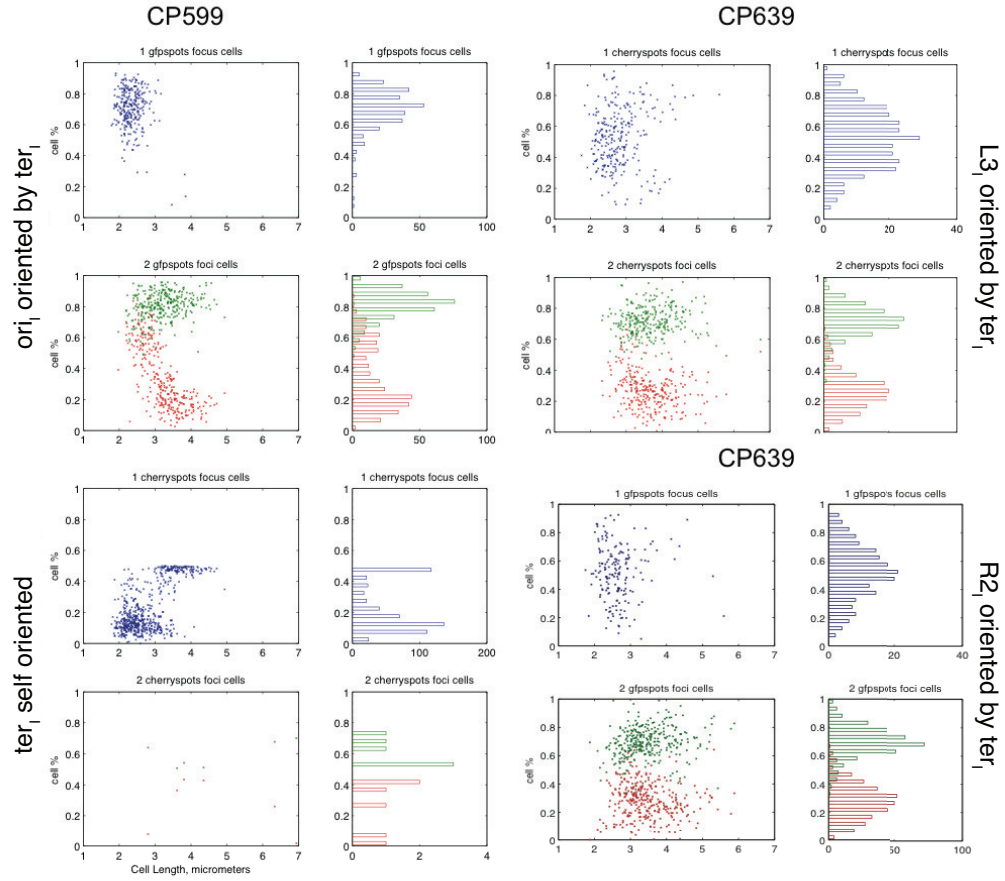


FIGURE 2.14 – Figure S6 : Raw Data for loci in strains $\Delta parS$: see legend in Figure S3

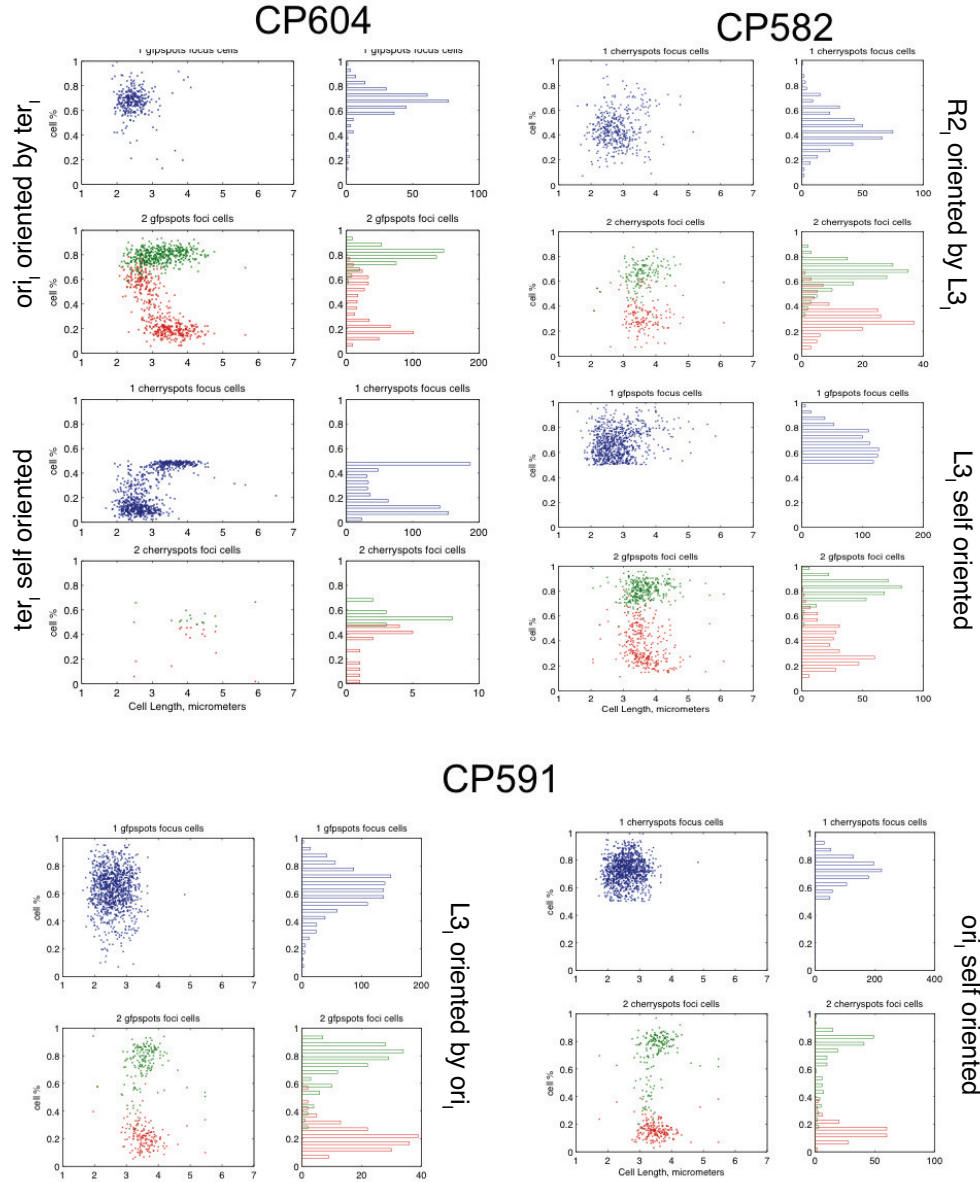


FIGURE 2.15 – Figure S7 : Raw Data for loci in strains $\Delta parS + parS_{300kb}$: see legend in Figure S3

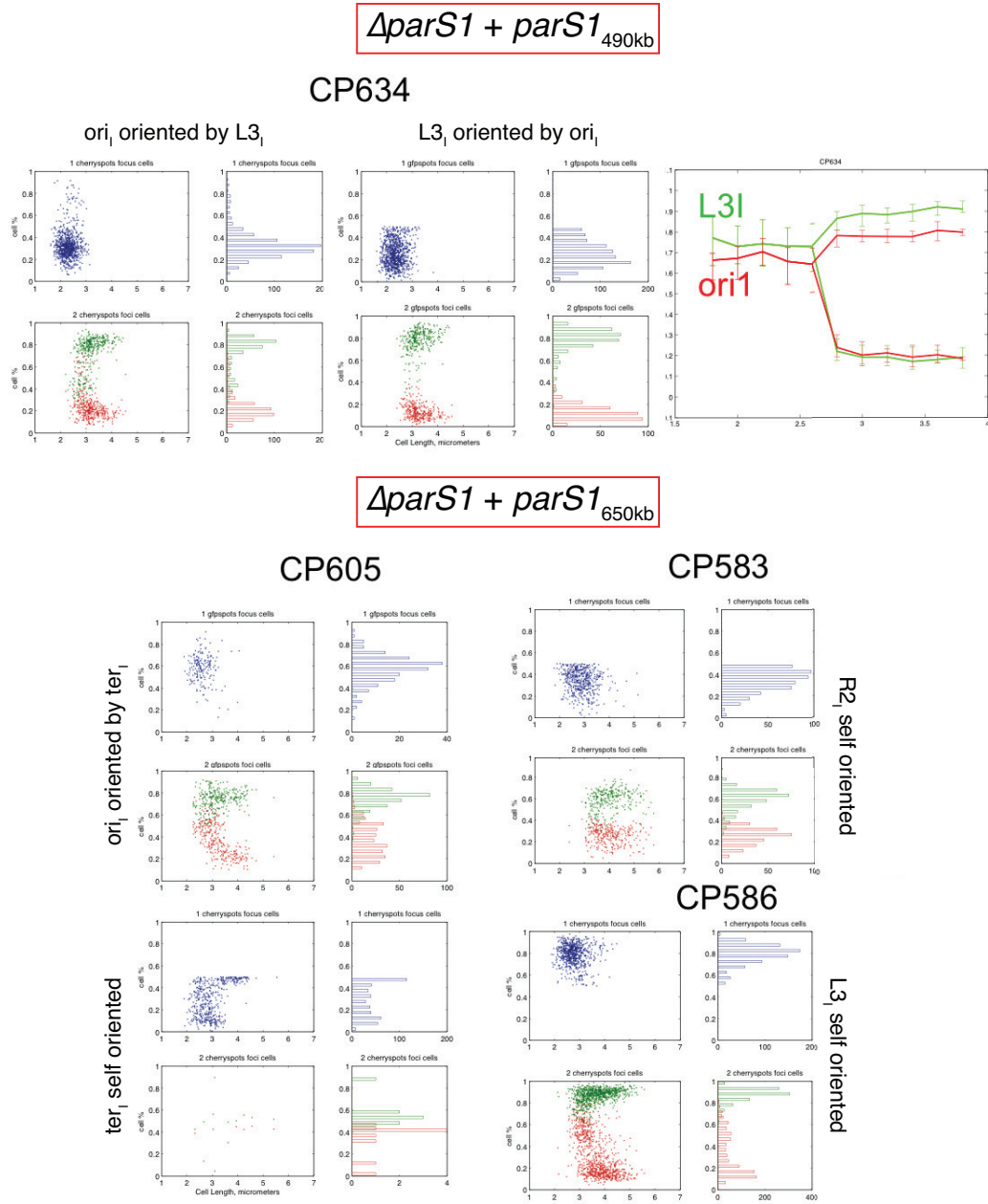


FIGURE 2.16 – **Figure S8** : Raw Data for loci in strains $\Delta parS + parS_{490kb}$ or $parS_{650kb}$: see legend in Figure S3

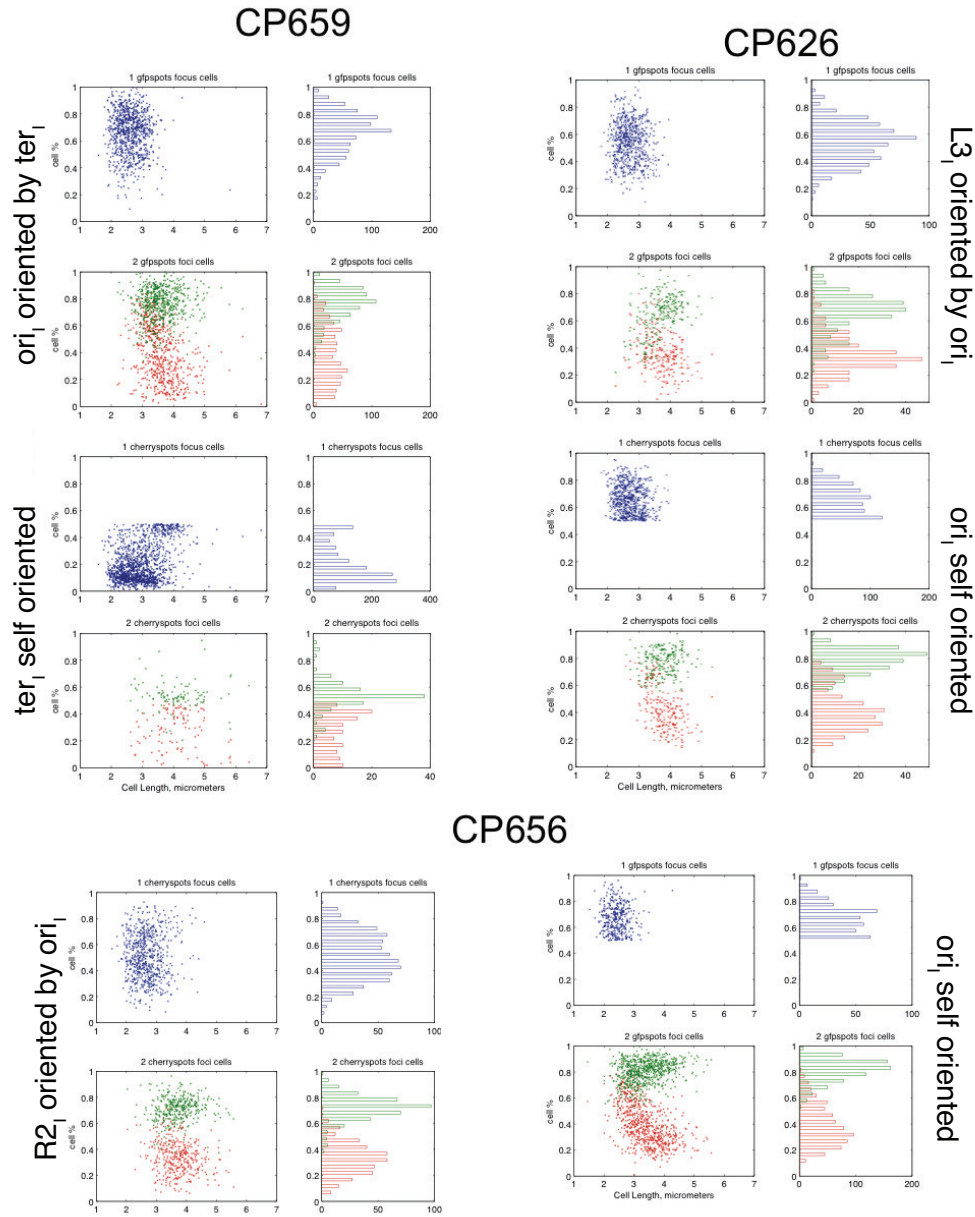


FIGURE 2.17 – Figure S9 : Raw Data for loci in strains $\Delta parS + ori1_{651kb}$: see legend in Figure S3

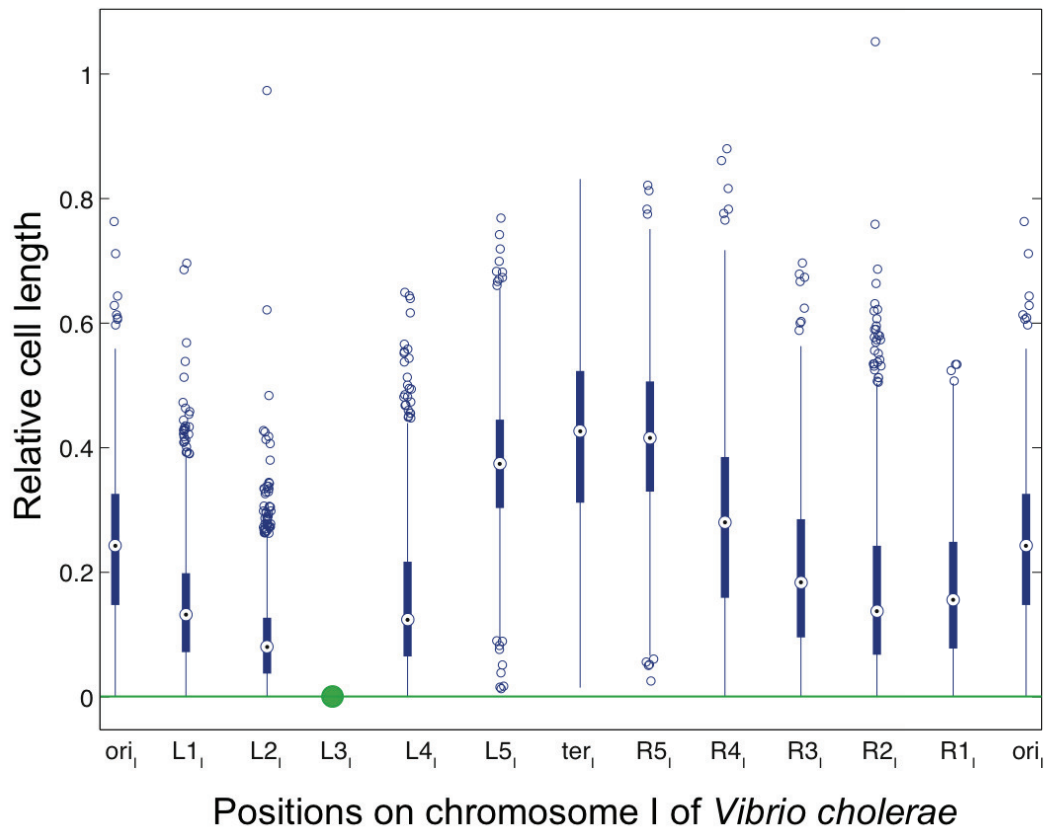


FIGURE 2.18 – **Figure S10 : Relative distance of the different tagged loci from the L3_I locus in newborn cells :** For each locus, the median (bar), the 25th and the 75th percentiles (box) of its distance to L3_I locus were indicated.

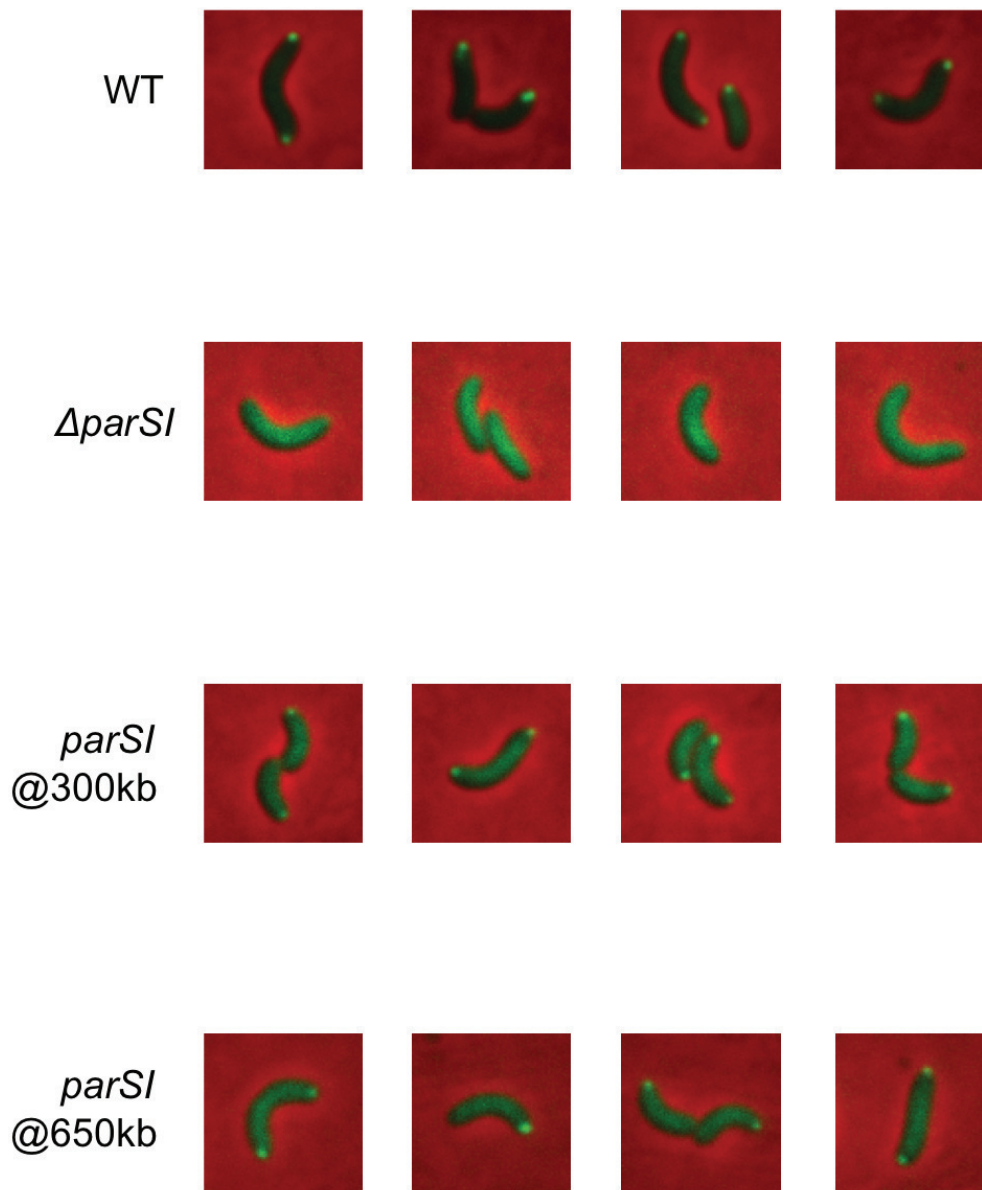


FIGURE 2.19 – Figure S11 : Localisation of YpET- $\Delta 30$ ParB1 in WT , $\Delta parSI$, *parSI*_{300kb} and *parSI*_{650kb} : Overlay of Phase contrast (red) and GFP images (green) showing representative cells of each strains grown in M9 Fructose Thiamine medium

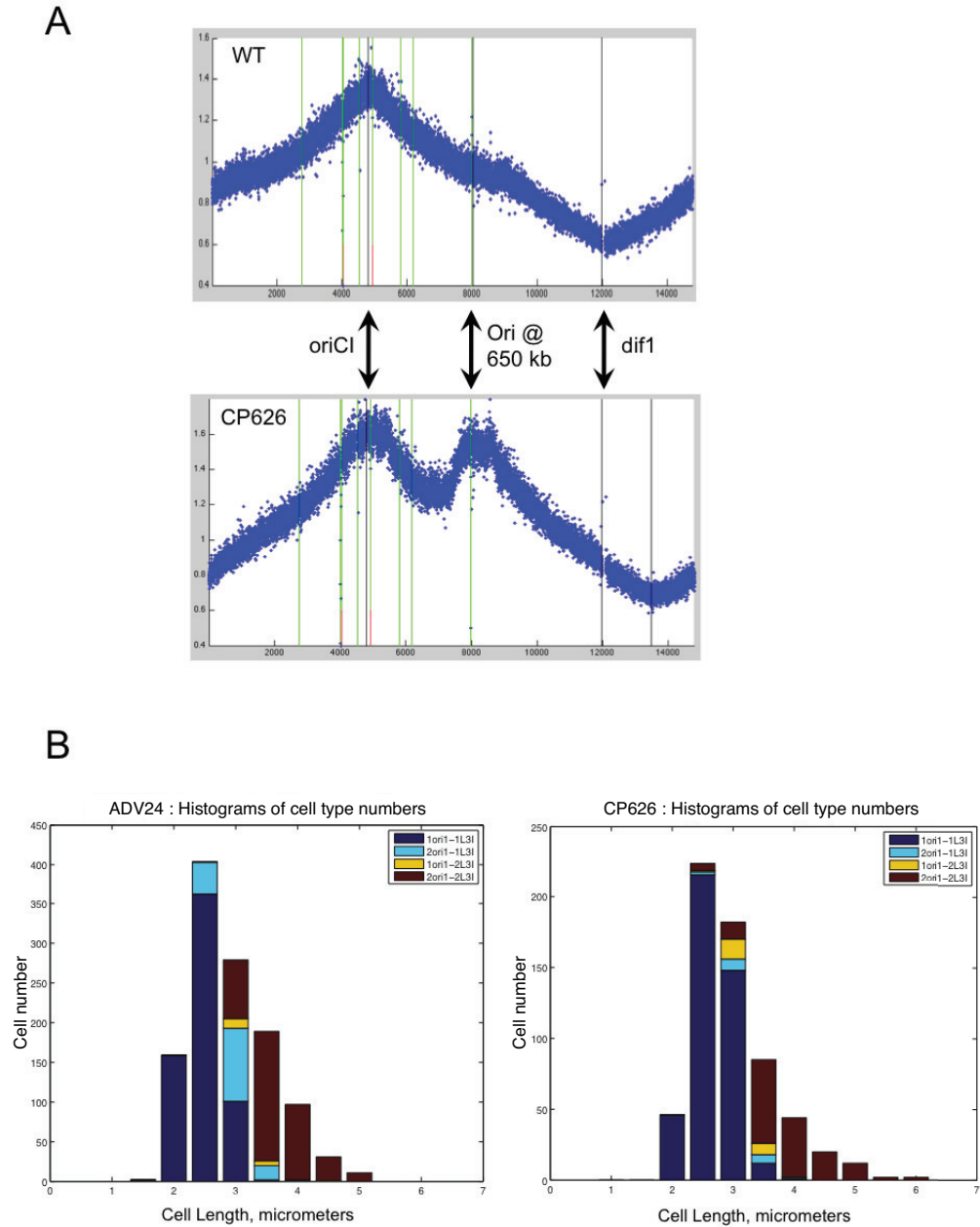


FIGURE 2.20 – **Figure S12 : Functionality of the ectopic *oriCI*_{650kb}** : Marker Frequency Analysis from Deep sequencing data of the chromosome I in WT (ADV24) and in *oriCI*_{650kb} (CP626). **(B)** Proportion of the different cell types in WT (ADV24) and in *oriCI*_{650kb} (CP626) : in dark blue, cells with 1 *oriI* and 1 *L3I* spot ; in light blue, cells with 2 *oriI* and 1 *L3I* spot ; in yellow, cells with 1 *oriI* and 2 *L3I* spots and in dark red, cells with 2 *oriI* and 2 *L3I* spots

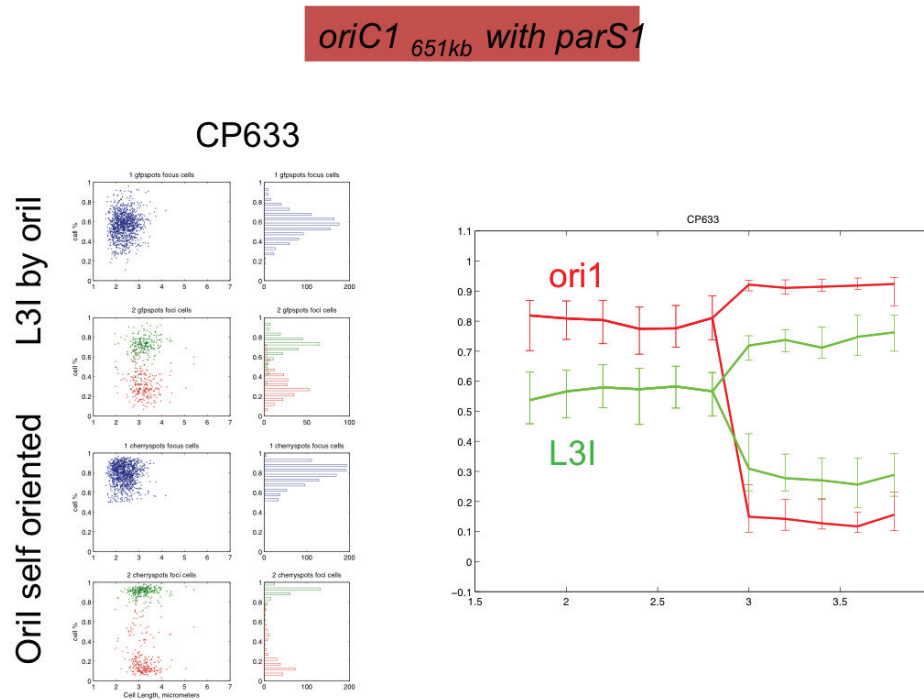


FIGURE 2.21 – **Figure S13 : *oriC1*_{651kb} contribution is masked in presence of *parS1* sites** : Oriented raw data and segregation choreography reconstruction of the chromosome I containing WT *parS1* sites and the ectopic *oriC1*_{651kb} (CP633)

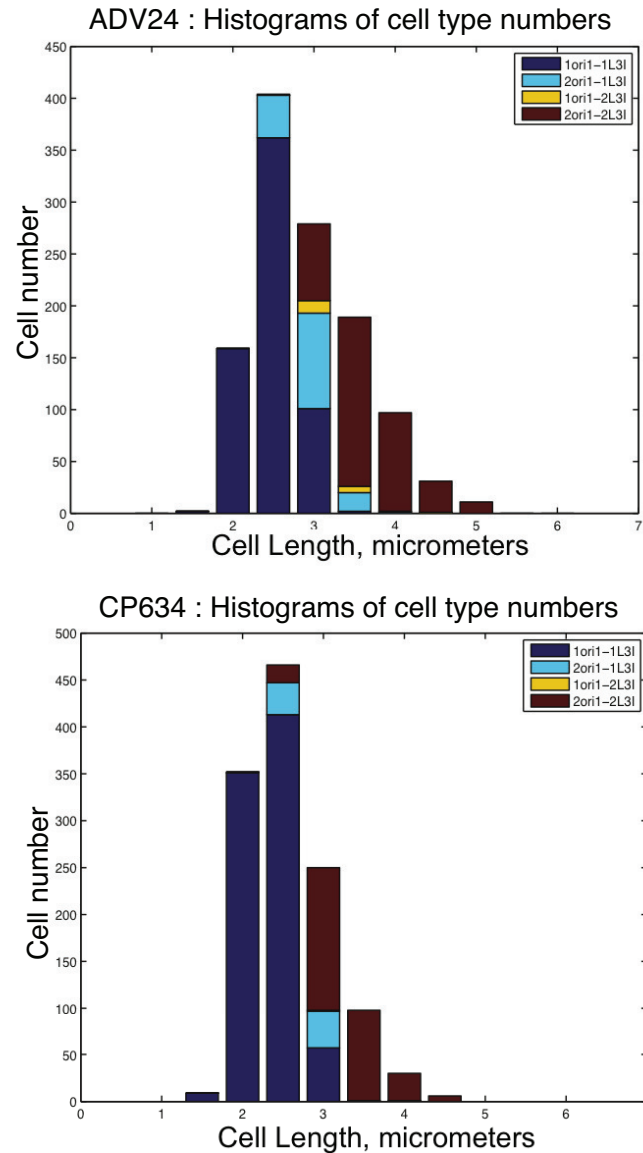


FIGURE 2.22 – Figure S14 : Absolute numbers for the different cell types in WT (ADV24) and in *parS1*_{490kb} (CP634) : In dark blue, cells with 1 ori_I and 1 L3_I spot ; in light blue, cells with 2 ori_I and 1 L3_I spot ; in yellow, cells with 1 ori_I and 2 L3_I spots and in dark red, cells with 2 ori_I and 2 L3_I spots

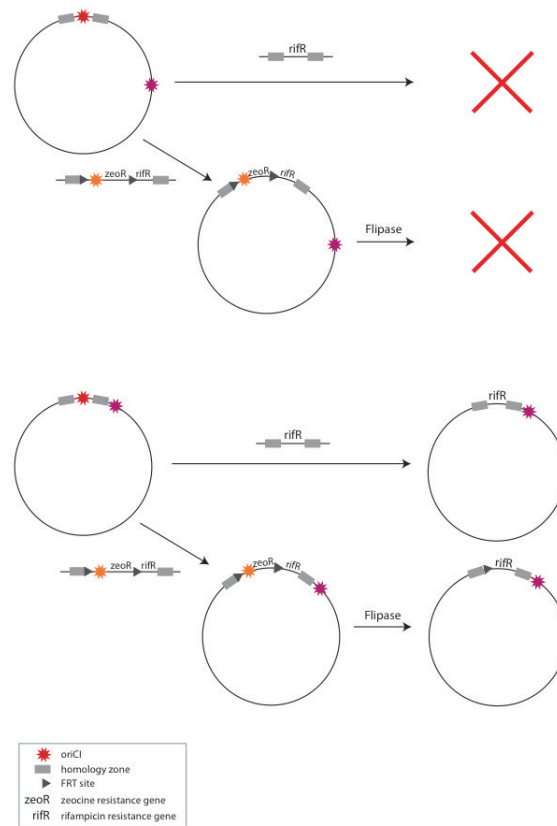


FIGURE 2.23 – **Figure S15 : Presence of *oriC1* site is essential within the origin region** : After introducing an ectopic *oriC1* using natural transformation with pPOS228, we tried to delete the WT Origin of replication of the chromosome I. Two strategies were performed : a direct deletion by replacing the *oriC1* with a *Rif* resistance gene (pAD43), or an indirect deletion, by first replacing *oriC1* by an *oriC1* flanked by FRT sites (pAD44) and secondly deleting it by inducing a Flipase protein (pFLP2, Sup. ref. (2)). When the second *oriC1* was introduced in the middle of the replicore (near *L3I* locus), we were unable to delete the WT *oriC1*, even though it was possible to replace it by a FRT-*oriC1*-FRT. It was however possible to delete this Origin when the second *oriC1* was only 50 kb from it.

2.3 Discussion

Cette étude a montré que le déplacement des sites *parS1* et l'ajout d'une origine de réplication pouvaient induire une rotation du chromosome I chez *Vibrio cholerae*. Cette rotation due à un déplacement du système de partition a déjà été observée chez *Caulobacter crescentus* [Umbarger *et al.* 2011], à l'exception que chez cette bactérie, le chromosome entier était repositionné, alors que pour le chromosome I, le terminus du chromosome I semble ne pas être affecté par la nouvelle position des *parS1*. Ceci est probablement dû au fait que *V. cholerae* possède un système MatP/*matS* qui chez *E. coli*, joue un rôle dans la compaction et le positionnement du macrodomaine *ter* au septum [Mercier *et al.* 2008], [Éspeli *et al.* 2012].

L'ordre de ségrégation des différents loci n'a pas changé après le déplacement des sites *parS1*, ce qui indiquerait que la position de ces sites affecte le positionnement mais pas la ségrégation du chromosome, ce qui avait pourtant été observé chez *C. crescentus* [Umbarger *et al.* 2011].

Il a été montré chez *B. subtilis* que les protéines ParB fixées aux sites *parS* recrutent le système SMC aux pôles, ce qui pourrait jouer un rôle dans la compaction du chromosome. En enlevant les sites *parS*, nous avons donc peut être affecté cette compaction et donc le positionnement du chromosome. Ce changement de compaction est peut être la raison pour laquelle nous observons une plus grande amplitude de mouvement pour différents loci dans une souche $\Delta parS$, comme si leur positionnement était moins contrôlé. Des souches *E. coli* $\Delta MukBEF$ (un homologue du système SMC) adoptent une organisation du chromosome *Ori-ter* longitudinale, comme pour le chromosome de *C. crescentus*. Ainsi dans des souches *Vibrio cholerae* $\Delta parS$, nous avons effectivement affecté le système de partition (ce que nous pensions être le frein principal à une organisation de type transversale *gauche-ori-droit* comme *E. coli*), mais aussi peut être le système MukBEF. Comme une délétion de ce système peut créer une organisation longitudinale, le fait que nous n'observons aucun changement en cas de simple délétion ne veut pas forcément dire que notre hypothèse était fautive. Il faudrait pour la vérifier, non pas enlever le système de partition, mais trouver un moyen de ne plus l'ancrer au pôle sans pour autant empêcher la fixation de ParB aux sites *parS*, afin de ne pas affecter le système MukBEF de *Vibrio cholerae*. Ceci étant dit, le système MukBEF ne semble pas avoir une influence aussi forte chez *V. cholerae* que chez *E. coli*, car une souche $\Delta mukBEF$ n'a pas de phénotype particulier. Ce qui est vrai pour un organisme n'est donc pas forcément transposable chez un autre.

Ainsi nous avons mis en évidence les principaux mécanismes de positionnement de l'origine du chromosome I, qui semblent affecter le reste du chromosome, à l'exception notable du terminus. Il serait intéressant d'étudier d'autres points autour de *dif1*, et de déterminer l'influence du système MatP/*matS* sur cette région.

Le chromosome II montre une organisation inédite pour les chromosomes bactériens : son origine positionnée au centre pouvait laisser penser que le reste du chromosome aurait une organisation transversale *gauche-ori-droite* comme pour le chromosome d'*E. coli*. Or, le chromosome II n'occupe que la moitié la plus "jeune" de la cellule

et présente une organisation longitudinale avec des réplichoires étirés entre l'origine et le terminus II. Ceci est peut être dû au fait que ce chromosome est d'origine plasmidique [Heidelberg *et al.* 2000] et a donc des mécanismes organisant sa structure différents des autres chromosomes principaux bactériens.

Un point important à relever est que le terminus de ce chromosome a un positionnement et une réplication différent de ceux observés pour les termini des chromosomes de toutes les espèces étudiées à ce jour : en effet, tous les termini observés migrent au centre de la cellule, au niveau du futur septum, et y restent jusqu'à la division. Les termini de *E. coli*, *C. crescentus*, *P. aeruginosa* ou *B. subtilis* sont répliqués en dernier (par définition) au centre de la cellule et ne se séparent qu'au moment de la division. Chez *E. coli*, ce retard de ségrégation est causé par la protéine MatP, qui lorsqu'elle se fixe sur les sites *matS*, compacte le macrodomaine *ter*. En plus de cette compaction, MatP interagit avec la protéine du divisome FtsK via la protéine ZapB [Espeli *et al.* 2012]. Cette interaction maintient les termini répliqués au septum jusqu'à la division et il est supposé que c'est la protéine FtsK, chargée de la ségrégation des termini [Stouf *et al.* 2013], qui enlève la protéine MatP et permet ainsi la séparation des termini au moment de la division.

Le chromosome II possède un système *matS*/MatP avec des sites *matS* autour de *ter_{II}*. On aurait donc pu s'attendre à retrouver un positionnement au septum jusqu'à la division pour ce locus. De plus, cela pose la question de la gestion de la ségrégation de ce terminus au moment de la division. Pour les chromosomes étudiés, FtsK joue un rôle essentiel dans cette ségrégation, mais il faut pour cela que les termini soient au septum au moment de la division. Comment le terminus du chromosome II est géré au moment de la division est donc un point essentiel pour comprendre la chorégraphie de ségrégation de ce chromosome.

L'article suivant porte donc sur l'étude du positionnement au septum des deux termini des chromosomes I et II de *Vibrio cholerae*, de façon précise grâce à un système génétique rapporteur.

Les régions terminales soeurs du chromosome II de *Vibrio cholerae* entrent en contact durant la division

Sommaire

3.1	Introduction	94
3.2	<i>Vibrio cholerae</i> chromosome II sister terminus regions contact each other during cell division	96
3.2.1	Abstract	97
3.2.2	Introduction	97
3.2.3	Results and discussion	98
3.2.3.1	Early separation of TerII sisters	98
3.2.3.2	Design of a molecular probe to detect sister chroma- tid contacts	98
3.2.3.3	High frequency of TerII SSC during septation	99
3.2.3.4	MatP drives ChII Ter sisters contacts at cell division	100
3.2.4	Material and methods	101
3.2.5	Acknowledgments	102
3.2.6	References	102
3.2.7	Figures	105
3.2.8	Supplementary Materials	109
3.2.9	Supplementary Tables	110
3.2.9.1	Supplementary Table 1. List of bacterial strains	110
3.2.9.2	Supplementary Table 2. List of plasmids	113
3.2.10	Supplementary References	114
3.2.11	Supplementary Figures	115
3.3	Discussion	120

3.1 Introduction

Le chromosome II est très proche d'un plasmide [Heidelberg *et al.* 2000]. Sa réplication est contrôlée par la présence d'itérons à l'origine de réplication sur lesquels vient se fixer un initiateur, tout comme les plasmides [Duigou *et al.* 2006], [Venkova-Canova & Chattoraj 2011], alors que la réplication du chromosome I est contrôlée par les mêmes mécanismes que pour le chromosome d'*E. coli* [Egan & Waldor 2003]. De plus, le chromosome II ne se réplique qu'une seule fois par cycle cellulaire, alors que le chromosome I est capable de réplication multiple, leurs cycles de réplifications semblent donc complètement différents et indépendants [Rasmussen *et al.* 2007].

L'origine du chromosome II se positionne comme celle d'un plasmide ou du chromosome d'*E. coli*, mais son terminus n'est pas positionné comme celui d'un chromosome : chez toutes les bactéries, le terminus du chromosome se positionne au septum avant la division et reste proche du nouveau pôle juste après la division [Éspeli *et al.* 2012], [Viollier *et al.* 2004], [Vallet-Gely & Boccard 2013] [Teleman *et al.* 1998]. Or pour le chromosome II, nous avons montré que les *ter_{II}* répliqués se ségrègent bien avant la division. Ceci pourrait être dû à une compétition pour de l'espace entre les deux chromosomes, ou à un héritage de l'origine plasmidique du chromosome II. Il est tout de même intéressant de constater que les deux chromosomes possèdent des sites *matS* autour de leur *dif*, comme *E. coli* chez qui il a été prouvé que ces sites et la protéine MatP les fixant, organisent la région autour du terminus de réplication en un macrodomaine, et maintiennent cette région proche du septum lors de la division [Éspeli *et al.* 2012]. Pour le chromosome I, ce système de compaction permettrait d'expliquer pourquoi le terminus n'est pas affecté par une rotation du chromosome induite par un déplacement des sites *parS1*. Mais cette fonction d'attachement au septum ne semble pas avoir d'effet sur le chromosome II, puisque les *ter_{II}* se séparent avant la division.

Un essai génétique a été utilisé afin de mesurer spécifiquement les interactions entre chromatides soeurs lors de la division. Nous avons mis à profit le système permettant la résolution des dimères de chromosomes chez les bactéries : en cas de dimère au moment de la division, les deux sites *dif* des deux chromosomes liés sont ramenés au septum par la protéine FtsK qui transloque l'ADN de façon dirigée par les sites KOPS orientés vers *dif* et disséminés le long des deux bras de réplication. Lorsque les deux sites *dif* se font face au septum, FtsK active les recombinaisons XerC et XerD, et celles-ci provoquent un cross-over supplémentaire entre les deux sites *dif* afin de séparer le dimère en deux monomères. En insérant une cassette d'excision contenant deux sites *dif* à un endroit précis sur le chromosome, il nous est donc possible de connaître la fréquence de contact au septum entre les chromatides soeurs après réplication, en mesurant le taux d'excision de la cassette, activée uniquement par FtsK au moment de la division.

Les essais génétiques réalisés par Gaëlle Demarre ont permis de montrer que les termini du chromosome II, bien que séparés avant la division selon la microscopie, reviennent au septum au moment de la division, et ceci grâce au système *matS*/MatP.

Ces résultats semblent en contradiction avec la reconstitution de ségrégation faite en observant des populations asynchrones. Mais ces événements étant probablement courts, il est possible que notre analyse précédente nous les aient fait rater. J'ai donc contribué aux travaux en mettant en place un protocole permettant de faire des films de croissance de lignées de cellules. Ces films avec une prise d'image très fréquente nous ont permis de montrer que les ter_{II} , après réplication, se séparent et reviennent au septum au moment de la division.

3.2 *Vibrio cholerae* chromosome II sister terminus regions contact each other during cell division

Gaëlle Demarre^{1,2}, Ariane David^{1,2}, Evelyne Paly^{1,2}, Christophe Possoz^{1,2} and François-Xavier Barre^{1,2,*}

¹ CNRS, Centre de Génétique Moléculaire, 91198 Gif-sur-Yvette, France

² Université Paris-Sud, 91405 Orsay, France

* Corresponding author

Email : barre@cgm.cnrs-gif.fr

Tel : +00 33 169 823 224

Fax : +00 33 169 823 150

Paper submitted in PLOS Genetics

3.2.1 Abstract

We used replication profiling to show that the actual replication terminus of each of the two *V. cholerae* chromosomes falls within 30kbp of their *dif* sites and confirmed the apparent early segregation of the replication terminus of chromosome II with respect to cell division by fluorescent microscopy. However, careful investigation of sister chromatid physical interactions along the two chromosomes revealed that chromosome II sister terminus regions come into contact during cell division, independently of chromosome dimer formation. This almost entirely depends on the MatP/*matS* chromosome organization factor. To our knowledge, this is the first functional role that can be assigned to MatP and the first evidence of a protein helping link sister chromatids until when a particular stage of cell division has been reached in bacteria. Taken together, our results suggest that the late segregation of the terminus regions of bacterial chromosomes, which was so far neglected as a passive feature, is a key feature of the bacterial cell cycle.

3.2.2 Introduction

Most bacteria harbour a single chromosome and, in the rare case in which the genetic material is divided on several chromosomes, the extranumerous chromosomes appear to derive from horizontally-acquired megaplasmids that subsequently gained essential genes (Egan *et al*, 2005). This is notably the case for *Vibrio cholerae*, the agent of the deadly human diarrheal disease cholera (Trucksis *et al*, 1998). Such an evolutionary scenario raised questions on the necessary coordination between replication, chromosome segregation and cell division in bacteria with multipartite genomes.

Bacterial chromosomes harbour a single origin of bidirectional replication Ori and are generally circular. Replication ends in a region opposite of Ori, the terminus (Ter), in which is usually found a site-specific recombination site dedicated to the resolution of chromosome dimers, *dif* (Kono *et al*, 2011). Likewise, the two *V. cholerae* chromosomes, chI and chII, are circular and they harbour a single *dif* site opposite their origin of replication, *dif1* for chI and *dif2* for chII (Val *et al*, 2008).

Fluorescent microscopic observation of chromosome segregation in monochromosomal bacteria revealed that it is concurrent with replication and starts with the active positioning of Ori sisters into opposite cell halves (Harms *et al*, 2013; Possoz *et al*, 2012; Vallet-Gely & Boccard, 2013). As replication progresses along the chromosome, newly replicated loci are rapidly segregated towards their future daughter cell positions. However, Ter sisters remain colocalized until the very end of septation. Correspondingly, distinct partition machineries drive the segregation of OriI and OriII, the respective Ori of chI and chII (Fogel & Waldor, 2006; Yamaichi *et al*, 2007) and observation of a locus situated at 40kbp from *dif1* suggested that sister copies of the Ter of chI (TerI) were segregated at the very end of the cell division cycle (Srivastava *et al*, 2006). However, sister copies of a locus situated at 49kbp from *dif2* were segregated well before septation, suggesting that the Ter of

chII (TerII) did not follow the general mode of segregation of bacterial chromosomes (Figure 1A, (Srivastava *et al.*, 2006)).

In *Escherichia coli*, the long midcell colocalization of Ter sisters is at least in part dictated by the MatP/*matS* Ter organisation system (Espeli *et al.*, 2012; Mercier *et al.*, 2008) and the active separation of Ter sisters seems to depend on an oriented DNA pump that is recruited to midcell as part of the divisome, FtsK (Dubarry & Barre, 2010; Saleh *et al.*, 2004; Stouf *et al.*, 2013). In addition, FtsK serves to promote recombination between sister *dif* sites during constriction (Kennedy *et al.*, 2008). The genome of *V. cholerae* encodes for an ortholog of *E. coli* MatP and *matS* motifs are repeated near *dif1* and *dif2*. Despite their sequence divergence, *dif1* and *dif2* are recombined by a common pair of recombinases, XerC and XerD, whose activity is controlled by a unique *E. coli* FtsK ortholog (Val *et al.*, 2008). Taken together, these observations suggested TerII might depend on the same chromosomal processes than TerI for segregation, in apparent contradiction with its early segregation (Figure 1A).

3.2.3 Results and discussion

3.2.3.1 Early separation of TerII sisters

Replication profiling of *V. cholerae* cells by deep sequencing indicated that replication most frequently ended on the opposite replicore than the reference loci that had been previously chosen to visualize TerI and TerII (Figure 1B). It was therefore possible that the behaviour of these loci did not fully reflect TerI and TerII segregation dynamics. To check this eventuality, we analysed the intracellular location of *dif1* and *dif2*, which are located at a distance of ~30kbp from the actual terminus. Less than 15% of the longest cells, i.e. the ones closest to division, displayed two *dif1* spots, confirming the very late segregation of TerI (Figure 1C). In contrast, two *dif2* spots were already observed in >50% of the cells as soon as they were half as long as dividing cells (Figure 1C). In addition, *dif2* spots were found to segregate further from midcell than *dif1* spots, confirming the early separation of TerII sisters (Figure 1D).

3.2.3.2 Design of a molecular probe to detect sister chromatid contacts

Lesterlin *et al.* monitored sister chromatid contacts (SCC) behind replication forks using an assay based on the interruption of the *lacZ* reporter gene by two copies of *loxP* (Lesterlin *et al.*, 2012). Intramolecular recombination was prevented by the proximity of the sites (the cleavage points of the Cre recombinases being separated by only 55bp) so that a functional *lacZ* ORF could only be reconstructed via intermolecular recombination events (Figure 2A). As *dif*-recombination is under the control of FtsK in *V. cholerae* (Val *et al.*, 2008), which was expected to restrict it to midcell and to the time of septum constriction (Kennedy *et al.*, 2008), we reasoned that 55bp *dif1*- and *dif2*-cassettes (*lac2dif1* and *lac2dif2*, respectively) could be used to monitor SCC during septation (Figure 2B).

We engineered a strain in which XerC production was under the control of the ara-

binose promoter to permit the stable inheritance of *dif*-cassettes. The *E. coli lacZ* promoter and the *E. coli lacI* repressor gene were inserted in anti-orientation at the end of the *xerC* ORF, the ATG translation initiation codon was replaced by the less favourable TTG codon and the ribosomal binding site was removed to help repress any leaky XerC production (Figure 2B).

Recombination of *lac2dif2* and *lac2dif1* strictly depended on XerC and FtsK (Figure 2C). We could thus use *lac2dif2* on chI and chII on *lac2dif1*, which avoids any risk of Xer-mediated intrachromosomal rearrangements during the course of the experiment (Figure 2D, (Das *et al*, 2010; Val *et al*, 2008)). Note that the presence of a homologous *dif* site on the other chromosome did not influence the proportion of blue colonies that were formed (Figure 2D and Supplementary Figure 1).

Both intramolecular and intermolecular recombination events can generate single *dif* site products. In contrast, three *dif* site products can only be generated via intermolecular recombination. Such products are transient because they can be converted to single *dif* products by subsequent intramolecular recombination (Figure 2A). Nevertheless, we could detect their apparition with 55bp cassettes, demonstrating that recombination occurred via SCC (Figure 3A). In contrast, three *dif* site products could not be detected with 1kbp cassettes (Figure 3A).

FtsK-YFP localized to midcell in long cells (Figure 3B, white arrow) and at one of the two poles in short cells (Figure 3B, white arrow head). This was reminiscent of the pattern of localization of the cell division machinery of *Caulobacter crescentus*, which assembles at midcell but remains bound to the new pole after cell scission (Goley *et al*, 2011). Time lapse observations confirmed that such a scenario applied to *V. cholerae* FtsK (Supplementary Figure 2A). Moreover, treating cells with cephalixin, which blocks septum constriction without affecting the recruitment of FtsK to the divisome (Figure 3C, lower panel), led to a dramatic reduction in the level of *dif*-recombination (Figure 3C). No growth proliferation defect and no cell viability loss were observed during the course of the cephalixin treatment (Supplementary Figure 2B). We conclude that *dif*-recombination occurs during or shortly after septation in *V. cholerae*.

Deletion of *recA* did not affect the proportion of excision events that could be detected using 55bp- and 1kbp-cassettes, indicating that activation of *dif*-recombination was independent from chromosome dimer formation (Figure 3D).

Taken together, these results demonstrated that *lac2dif1* and *lac2dif2* could be used as a relative measure of SCC between monomeric chromosomes during septation.

3.2.3.3 High frequency of TerII SSC during septation

Cells in which *lac2dif1* was inserted at the *dif* locus of chII yielded ~90% of blue colonies and a high proportion of blue colonies (~60%) was obtained for insertions within a 160kbp region surrounding *dif2* (Figure 4B). Based on the number of generations that was reached in the course of the experiments, we estimate that SCC occurs in >25% of the cell division events (see Supplementary Material). This is an underestimation since reconstitution of a functional *lacZ* gene requires at least

two successive intermolecular site-specific recombination events between properly aligned recombination sites (supplementary Figure 3). SSC were not diminished in cells in which *recA* was deleted, confirming that they were not linked to the presence of chromosome dimers (supplementary Figure 4). We conclude that monomeric TerII sister chromatids physically interact during septation. This was proved by timelapse microscopy, showing that TerII sister chromatids indeed come back at the site of septation during the very last stages of division (Supplementary Figure 5).

How can we reconcile these results with the fluorescent microscopy observations that suggested an early separation of TerII sisters? We think that a few catenation loops impede the complete separation of chII sisters. This allows for the loading of FtsK on TerII sisters during septation and the transient alignment of sister copies of TerII loci. Such a scenario could explain the peak of cohesion observed at the *dif* locus (Figure 4A and 4B) since FtsK is directed towards *dif* by the presence of KOPS (Bigot *et al*, 2006; Bigot *et al*, 2005) and stopped by XerCD/*dif* complexes (Bonne *et al*, 2009; Graham *et al*, 2009). A few catenation loops would not impede the separation of TerII sister loci prior to septation and transient midcell relocalization would be easily missed by fluorescent microscopy.

3.2.3.4 MatP drives ChII Ter sisters contacts at cell division

20% of TerI SSC were lost upon *matP* disruption (Figure 4C). More strikingly, 75% of TerII SSC were lost upon *matP* disruption (Figure 4D). In addition, SSC remained very high in most of the *matS* region of chII (Figure 4). The only notable exception was next to a site that is isolated from the rest of the region by the *V. cholerae* superintegron (Figure 4). The remaining TerI and TerII SSC stayed independent from homologous recombination (supplementary Figure 4).

Taken together, these results suggest that MatP is the main factor responsible for the occurrence of TerII SCC during septation and that it also modestly contributes to TerI SSC. The MatP/*matS* terminus organization system can bridge distant DNA segments (Dupaigne *et al*, 2012). It is therefore reasonable to argue that MatP helps stabilize or create DNA loops between TerI and TerII sisters. Interestingly, FtsK has been shown to remove MatP from *matS* sites, in agreement with the idea that it could transiently align sister copies of Ter loci (Graham *et al*, 2009). To our knowledge, this is the first direct evidence of a process delaying the separation of sister chromatids to a particular stage of the cell cycle in bacteria, which is similar to eukaryotic cohesion.

We think that the late midcell positioning of TerI is due to multiple redundant factors in addition to MatP. It is tempting to argue that these factors are common to most bacteria in which Ter sisters colocalize at midcell until the end of septation, but that they could not, or might not yet, be adapted to the management of the recently acquired *V. cholerae* chII. As a result, the MatP/*matS* system was left as the sole contributor for TerII SSC during cell division, which helped reveal its action. We are currently investigating the relative contribution of likely candidates for TerI midcell localization using the power of our SCC assay.

The current view of bacterial chromosome segregation is that the active positioning of Ori sisters sets the pace for the progression of the rest of the cell cycle events at each round of synthesis of the genetic material (Thanbichler, 2010). In contrast, Ter sisters segregation is viewed as a passive process (Harms *et al*, 2013; Possoz *et al*, 2012; Srivastava *et al*, 2006; Vallet-Gely & Boccard, 2013). On the contrary, our results suggest that the late segregation of Ter might be a key feature of the bacterial cell cycle. In this regard, it is remarkable to observe that, even though initiation of chII replication responds to the same global regulatory networks than chI initiation (Demarre & Chattoraj, 2010), it occurs at a later time point in the cell cycle (Rasmussen *et al*, 2007), which results in quasi-synchronous chI and chII replication termination (Figure 1). We are attracted to the idea that the late segregation of Ter might serve to establish a checkpoint to coordinate the latest stages of cell division and chromosome segregation. FtsK, which acts both as the driving force to faithfully distribute the genetic material into daughter cells during septation and as an essential brick in the assembly and stabilization of the cell division machinery, is ideally suited to create such a checkpoint (Dubarry *et al*, 2010).

3.2.4 Material and methods

Strains and plasmids Bacterial strains and plasmids used in this study are listed in Supplementary Tables 1 and 2, respectively. *V. cholerae* strains were derivatives of the El Tor N16961 strain.

Replication profiling Enrichment of uniquely mapping sequence tags within the genomic DNA of exponentially-growing (replicating) cells was calculated in 200bp windows, relative to the frequency of tags within the genomic DNA of stationary-phase (non-replicating) cells to correct for differences in read depth across the genome and to allow presentation of the data as a marker frequency (Rudolph *et al*, 2013).

Fluorescent microscopy observations A *lacO* array was inserted adjacent *dif1* and a PMT1 *parS* was inserted adjacent to *dif2*. LacI^{E.coli-mCherry} and yGFP-ParB^{PMT1} were produced via the leaky expression of a synthetic operon under the *E. coli lacZ* promoter that was inserted at the *V. cholerae lacZ* locus. A C-terminal fusion between FtsK and a yellow fluorescent protein, FtsK-YFP, was inserted in place of the endogenous *V. cholerae ftsK* allele to visualize its localisation.

***dif* recombination assays** 0.2mM IPTG were used to repress *xerC* transcription. 0.1% arabinose was used to produce XerC. Freshly grown cultures were diluted in 5mL of LB supplemented with arabinose to reach 0.02 of optical density at 600 nm. They were incubated for 180mn at 37 ° C with shaking. Serial dilutions of the cells were plated on LB agar plate supplemented with X-gal and IPTG before and after the induction of recombination. Cephalixin was added at the final concentration of 10µg/ml at the same time as the arabinose. Cells were collected at the

beginning of the incubation and after 40, 80 and 120mn. Genomic DNA was extracted to perform a southern blot using a 1kbp fragment corresponding to the *lacZ* promoter as a probe. 1kbp and 55bp recombination products were analysed using an EcoRV/HphI digest and 1.7% agarose gel, respectively. Signals were detected using a Typhoon instrument and quantitated using the IQT 7.0 software (GE Healthcare).

3.2.5 Acknowledgments

We wish to thank M. Blokesch and J. Bischerour for *V. cholerae* chromosomal engineering tools, F. Boccard and O. Espeli for helpful discussions. We would like to acknowledge financial support from the Agence Nationale pour la Recherche [ANR-09-BLAN-0258] and from the European Research Council under the European Community's Seventh Framework Programme [FP7/2007-2013 Grant Agreement no. 281590]. A.D. was a recipient of a CNRS/DGA PhD fellowship.

3.2.6 References

Bigot S, Saleh OA, Cornet F, Allemand JF, Barre FX (2006) Oriented loading of FtsK on KOPS. *Nat Struct Mol Biol* 13(11) : 1026-1028

Bigot S, Saleh OA, Lesterlin C, Pages C, El Karoui M, Dennis C, Grigoriev M, Allemand JF, Barre FX, Cornet F (2005) KOPS : DNA motifs that control *E. coli* chromosome segregation by orienting the FtsK translocase. *EMBO J* 24(21) : 3770-3780

Bonne L, Bigot S, Chevalier F, Allemand JF, Barre FX (2009) Asymmetric DNA requirements in Xer recombination activation by FtsK. *Nucleic Acids Res* 37(7) : 2371-2380

Das B, Bischerour J, Val M-E, Barre FX (2010) Molecular keys of the tropism of integration of the cholera toxin phage. *PNAS* 107(9) : 4377-4382

Demarre G, Chattoraj DK (2010) DNA adenine methylation is required to replicate both *Vibrio cholerae* chromosomes once per cell cycle. *PLoS Genet* 6 : e1000939

Dubarry N, Barre FX (2010) Fully efficient chromosome dimer resolution in *Escherichia coli* cells lacking the integral membrane domain of FtsK. *EMBO J* 29(3) : 597-605

Dubarry N, Possoz C, Barre FX (2010) Multiple regions along the *Escherichia coli* FtsK protein are implicated in cell division. *Mol Mic* 78(1088-1100) : 1088-1100

Dupaigne P, Tonthat NK, Espeli O, Whitfill T, Boccard F, Schumacher MA (2012) Molecular basis for a protein-mediated DNA-bridging mechanism that functions in condensation of the *E. coli* chromosome. *Mol Cell* 48(4) : 560-571

Egan ES, Fogel MA, Waldor MK (2005) Divided genomes : negotiating the cell cycle in prokaryotes with multiple chromosomes. *Mol Microbiol* 56(5) : 1129-1138

Espeli O, Borne R, Dupaigne P, Thiel A, Gigant E, Mercier R, Boccard F (2012) A MatP-divisome interaction coordinates chromosome segregation with cell division in *E. coli*. *EMBO J* 31(14) : 3198-3211

Fogel MA, Waldor MK (2006) A dynamic, mitotic-like mechanism for bacterial chromosome segregation. *Genes Dev* 20(23) : 3269-3282

Goley ED, Yeh YC, Hong SH, Fero MJ, Abeliuk E, McAdams HH, Shapiro L (2011) Assembly of the *Caulobacter* cell division machine. *Mol Microbiol* 80(6) : 1680-1698

Graham JE, Sivanathan V, Sherratt DJ, Arciszewska LK (2009) FtsK translocation on DNA stops at XerCD-dif. *Nucleic Acids Res* 38(1) : 72-81

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(9) : e1003802

Kennedy SP, Chevalier F, Barre FX (2008) Delayed activation of Xer recombination at dif by FtsK during septum assembly in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 68(4) : 1018-1028

Kono N, Arakawa K, Tomita M (2011) Comprehensive prediction of chromosome dimer resolution sites in bacterial genomes. *BMC Genomics* 12(1) : 19

Lesterlin C, Gigant E, Boccard F, Espeli O (2012) Sister chromatid interactions in bacteria revealed by a site-specific recombination assay. *EMBO J* 31(16) : 3468-3479

Mercier R, Petit MA, Schbath S, Robin S, El Karoui M, Boccard F, Espeli O (2008) The MatP/*matS* site-specific system organizes the terminus region of the *E. coli* chromosome into a macrodomain. *Cell* 135(3) : 475-485

Possoz C, Junier I, Espeli O (2012) Bacterial chromosome segregation. *Front Biosci (Landmark Ed)* 17 : 1020-1034

Rasmussen T, Jensen RB, Skovgaard O (2007) The two chromosomes of *Vibrio cholerae* are initiated at different time points in the cell cycle. *Embo J* 26(13) : 3124-3131

Rudolph CJ, Upton AL, Stockum A, Nieduszynski CA, Lloyd RG (2013) Avoiding chromosome pathology when replication forks collide. *Nature* 500(7464) : 608-611

**Chapitre 3. Les régions terminales soeurs du chromosome II de *Vibrio*
104 *cholerae* entrent en contact durant la division**

Saleh OA, Perals C, Barre FX, Allemand JF (2004) Fast, DNA-sequence independent translocation by FtsK in a single-molecule experiment. EMBO J 23(12) : 2430-2439

Srivastava P, Fekete RA, Chatteraj DK (2006) Segregation of the replication terminus of the two *Vibrio cholerae* chromosomes. J Bacteriol 188(3) : 1060-1070

Stouf M, Meile JC, Cornet F (2013) FtsK actively segregates sister chromosomes in *Escherichia coli*. Proc Natl Acad Sci U S A 110(27) : 11157-11162

Thanbichler M (2010) Synchronization of chromosome dynamics and cell division in bacteria. Cold Spring Harb Perspect Biol 2(1) : a000331

Trucksis M, Michalski J, Deng YK, Kaper JB (1998) The *Vibrio cholerae* genome contains two unique circular chromosomes. Proc Natl Acad Sci U S A 95(24) : 14464-14469

Val M-E, Kennedy SP, El karoui M, Bonné L, Chevalier F, Barre F-X (2008) FtsK-dependent dimer resolution on multiple chromosomes in the pathogen *Vibrio cholerae*. PLoS Genet 4(9) : e1000201

Vallet-Gely I, Boccard F (2013) Chromosomal organization and segregation in *Pseudomonas aeruginosa*. PLoS Genet 9(5) : e1003492

Yamaichi Y, Fogel MA, Waldor MK (2007) par genes and the pathology of chromosome loss in *Vibrio cholerae*. Proc Natl Acad Sci U S A 104(2) : 630-635

3.2.7 Figures

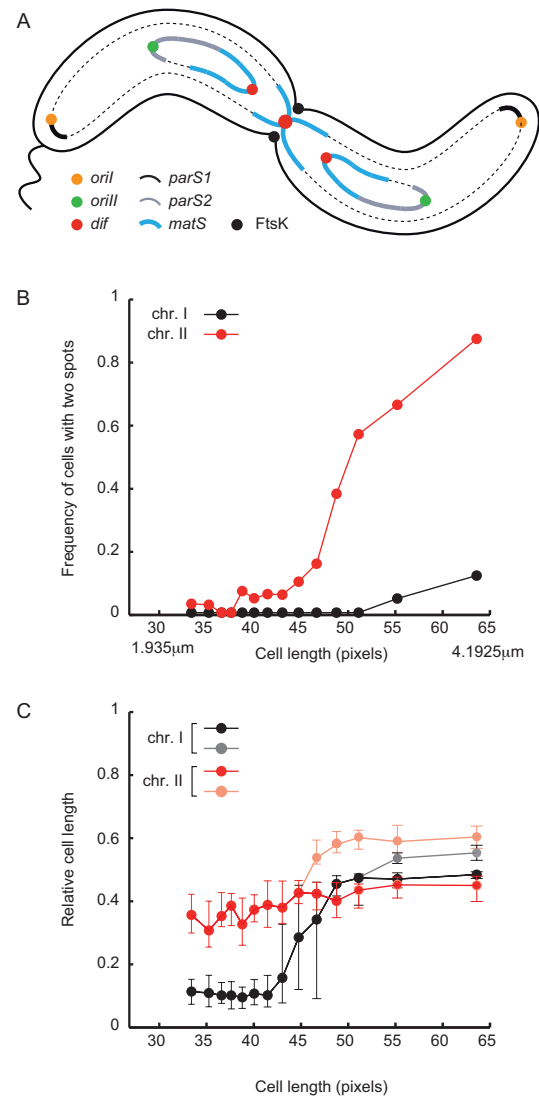


FIGURE 3.1 – **Figure 1. Early segregation of *V. cholerae* TerII** : **A.** Schematic representation of the two sister chromatids of each of the two *V.cholerae* chromosomes during septation. **B.** Separation of the sister copies of the *dif* locus of each of the two *V. cholerae* chromosomes. **C.** Relative position of *dif1* and *dif2* positions along the long axis of the cells as a function of cell length

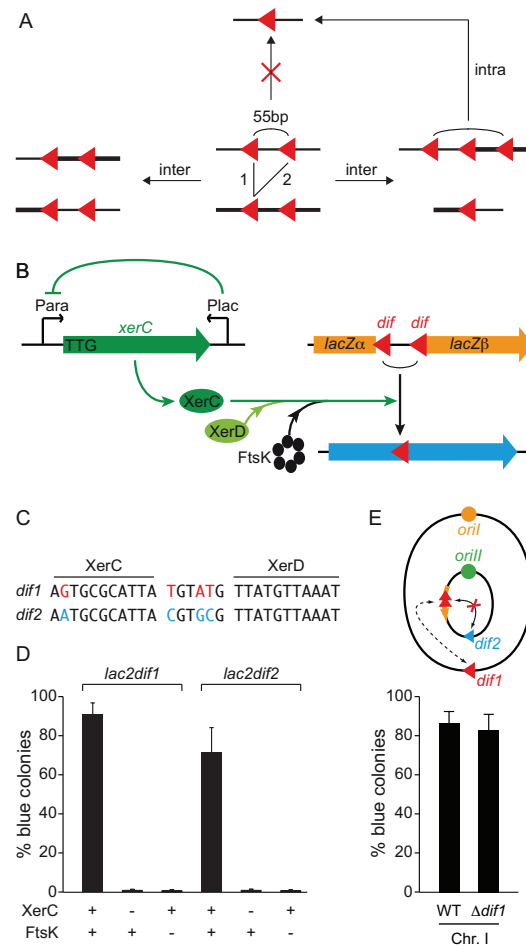


FIGURE 3.2 – Figure 2. FtsK-dependent Xer recombination at *dif* as a tool to monitor sister chromatid contacts : **A.** Scheme of the different site-specific recombination products that can be obtained when intramolecular recombination is impeded. **B.** Schematic representation of the 55bp *dif*-recombination cassettes and the Xer recombination control set up. The orange arrow represents the *lacZ* gene disrupted by the two *dif* sites (red triangle). Expression of the *xerC* gene (green arrow) is under the positive control of the arabinose promoter, PBAD, and the negative control of the *E. coli lacZ* promoter, PLac. **C.** *dif1* and *dif2* sequence divergence and incompatibility. The DNA binding arms of XerC and XerD are shown. Bases that differ in *dif1* and *dif2* are shown in red and blue, respectively. **D.** Reconstitution of a functional *lacZ* gene depends on XerC and FtsK. Results from at least three independent experiments. **E.** Recombination between *dif* sites harboured on different chromosomes does not perturb the SSC detection. Schematic representation of the genome of a strain harbouring *lac2dif1* on chII. No intrachromosomal recombination can occur between *lac2dif1* and *dif2* because of sequence incompatibility. The influence of chI *dif1* on chII *lac2dif1* recombination was tested by comparing results obtained in a strain in which *dif1* was deleted. Results from at least three independent experiments

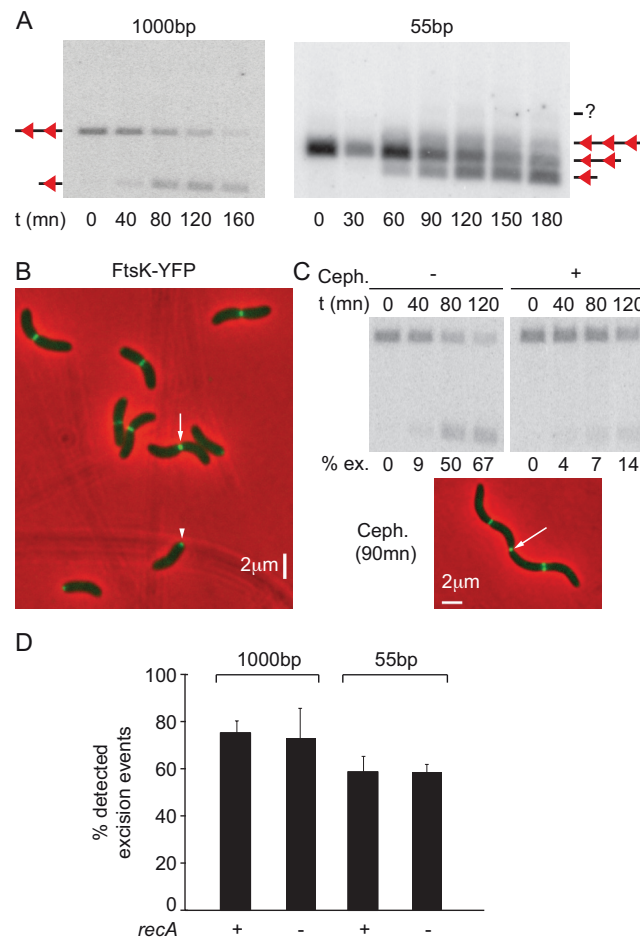


FIGURE 3.3 – **Figure 3. Structural, spatial and temporal restriction of *dif* cassette recombination** : **A**. Southern blot showing the different recombination products obtained with a 1kbp cassette and a 55bp cassette inserted at the *dif* locus of chromosome I. **B**. Localization of FtsK-YFP in cells. The scale is shown with a white bar. The white arrow indicates a cell where FtsK is located at a septum while in constriction ; the white arrowhead shows a cell where FtsK is located at the new pole. **C**. Upper panels : southern blot showing the excision of a 1kbp cassette inserted at the *dif* locus of chromosome I, without or with cephalaxin treatment. t : time of the experiment ; ex. : excision frequency. Lower panel : snapshot showing that cephalaxin treatment results in filamentation but does not prevent FtsK localization to mid-cell. **D**. RecA-independent recombination between *dif* sites inserted at the *dif* locus of chromosome I

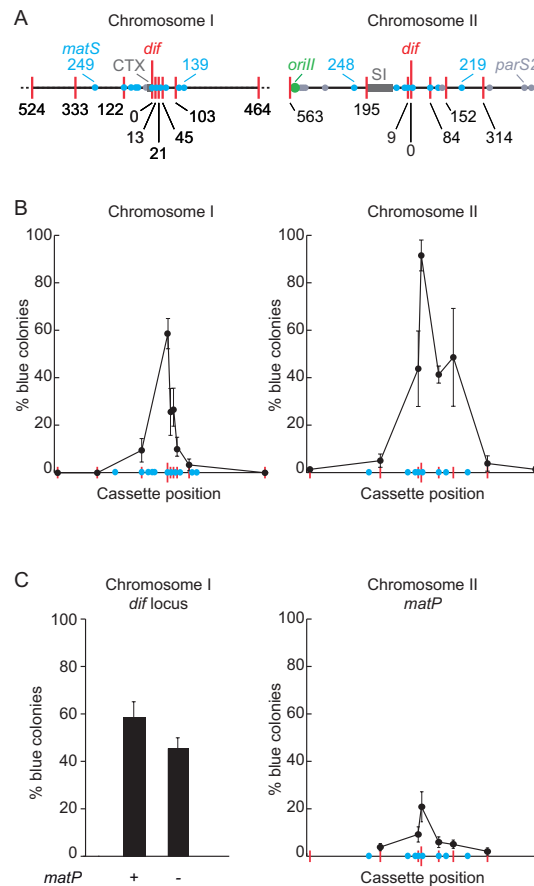


FIGURE 3.4 – Figure 4. Influence of the MatP/*matS* terminus organization factor sister chromatid contacts at the time of cell division : A. Relative frequency of SSC as a function of the position of the distance from the *dif* locus of chromosome I. Upper panel : map of a 1Mbp chromosome I region centred on *dif1*. Red bars : positions of the *lac2dif2* cassettes; blue disks : position of *matS* sites; light grey disks : positions of *parS2* sites; dark grey rectangle : IMEX insertion sequence (CTX). Distances in kbp are indicated as a function from the *dif* locus. Lower panel : results from at least three independent experiments. **B.** Relative frequency of sister chromatid contacts as a function of the position of the distance from the *dif* locus of chromosome II. Upper panel : map of chromosome II centred on *dif2*. Red bars : positions of *lac2dif1* cassettes; blue disks : positions of *matS* sites; light grey disks : positions of *parS2* sites; dark grey rectangle : super-integron (SI) insertion sequence. Distances in kbp are indicated as a function from the *dif* locus. Lower panel : results from at least three independent experiments. **C.** Influence of MatP on sister chromatid contacts at the *dif* locus of chromosome I. Results from at least three independent experiments. **D.** Influence of MatP on chromosome II sister chromatid contacts. Results from at least three independent experiments

3.2.8 Supplementary Materials

Estimation of the rate of formation of β -galactosidase⁺ cells per generation The rate of formation of β -galactosidase⁺ cells per generation, r , equals $1 - e^{\ln(1-f)/n}$, where f is the frequency of fully blue colonies measured after a given period and n is the number of cell divisions that occurred during this period. During the three hours of our assays, cells underwent ~ 8 divisions, as judged by the number of colony forming units at the beginning and at the end of the experiments. On chromosome II, the frequency of blue colonies reached $\sim 90\%$ (Figure 4B), which corresponds to a rate of formation of β -galactosidase⁺ cells, r_{II} , of $\sim 25\%$ per cell generation.

***V. cholerae* genetic engineering** All *V. cholerae* mutants were constructed by integration/excision or natural transformation. To this end, a derivative of the El Tor *V. cholerae* N16961 was rendered competent by the insertion of *hapR* by specific transposition [1]. Engineered strains were confirmed by PCR and by sequencing of the junctions.

Construction of an insertion library and insertion of the recombination cassette around chromosome I and II A library of the N16961 *V. cholerae* strain was built using a mariner transposon to integrate the *tetR* gene using tetracyclin resistance as a selection. The insertion was mapped in 100 of the clones by direct sequencing of the DNA flanking the point of insertion by arbitrary-random PCR [2]. Out of this collection, we chose clones in which the *tetR* insertions occurred outside an open reading frame and outside an obvious promoter. These insertions were checked by PCR and their unicity by southern blot. While *tetR* conferred sufficient resistance for the construction of the library, it failed as a selective marker for natural transformation. Therefore, we inserted the *zeo* gene within the *tetR* sequence of each of the clones of interest of our library using pGD162. Resistance to zeocin could then be used to recover the positions into GDV28 by natural transformation. The *tet-zeo-tet* cassette was introduced at the following coordinates of chromosome I, 53.36 kbp, 427 kbp, 613 kbp, 798 kbp, 1100 kbp, 1462 kbp, 1686 kbp, 1898 kbp, 2088 kbp, 2237 kbp and 2502 kbp; and at the following coordinates of chromosome II 498 kbp, 591 kbp, 659 kbp, 821 kbp and 1049 kb. These positions were completed by the insertion of the *tet-zeo-tet* cassette at 1519 kbp, 1543 kbp and 1551 kbp on chromosome I and at 312 kbp on chromosome II using vectors carrying the homology regions surrounding the relevant coordinates. Finally, specific vectors were constructed to insert the *tet-zeo-tet* cassette at the *dif1* locus and at the *dif2* locus, with or without deleting the original *dif* site and, in the case of the *dif2* locus, into the two possible orientations.

3.2.9 Supplementary Tables

3.2.9.1 Supplementary Table 1. List of bacterial strains

Name	Relevant genotype or features	Cassette	Type	Size	Position Chr, co-ordinate (kb)	Reference
N16961 ChapR	N16961 : mTh7hapR strepR gmR	none	none			[3]
ADV64	N16961 ChapR ΔlacZ : :(lacI-mcherry-YGFP-parBT1) lacO-aph inserted on chrII 1049 parST1-cat inserted next to dif2	none	none			This study
ADV78	N16961 ChapR ΔlacZ : :(lacI-mcherry-YGFP-parBT1) lacO-aph inserted next to dif1 parST1-cat on chrI 53	none	none			This study
FXV1a	GDV21 ftsK-GFP- Sh ble zeoR	none	none			This study
GDV21	N16961 ChapR ΔlacZ strepR gmR	none	none			This study
GDV28	GDV21 xerCind-aadA1 specR	none	none			This study
GDV192	GDV28 cmR	dif2-dif2	dif2-dif2	55bp	I ; 1564 (dif1)	This study
GDV210	GDV28 cmR	dif2-dif2	dif2-dif2	1kb	I ; 1564 (dif1)	This study
GDV211	GDV28 cmR	dif2-dif2	dif2-dif2	55pb	I ; 1564 (dif1)	This study
GDV221	GDV21 ΔxerC : :arr2 rifR	none	none			This study
GDV235	GDV28 cmR	dif1-dif1	dif1-dif1	55bp	II ; 507 (dif2)	This study
GDV236	GDV28 cmR	dif1-dif1	dif1-dif1	1kb	II ; 507 (dif2)	This study
GDV237	GDV28 Δdif2 cmR	dif1-dif1	dif1-dif1	55bp	II ; 507 (dif2)	This study
GDV238	GDV28 Δdif2 cmR	dif1-dif1	dif1-dif1	1kb	II ; 507 (dif2)	This study
GDV241	GDV28 ΔrecA : :aph kmR cmR	dif1-dif1	dif1-dif1	55bp	II ; 507 (dif2)	This study
GDV242	GDV28 ΔrecA : :aph kmR cmR	dif1-dif1	dif1-dif1	1kb	II ; 507 (dif2)	This study
GDV243	GDV28 Δdif2 ΔrecA : :aph kmR cmR	dif1-dif1	dif1-dif1	55bp	II ; 507 (dif2)	This study

3.2. *Vibrio cholerae* chromosome II sister terminus regions contact each other during cell division

111

Name	Relevant genotype or features	Cassette	Position Chr, co-ordinate (kb)	Reference
GDV244	GDV28 Δ dif2 Δ recA : :aph kmR cmR	dif1-dif1	II ; 507 (dif2)	This study
GDV245	GDV28 Ftsk Δ C : :arr2 cmR rifR	dif1-dif1	II ; 507 (dif2)	This study
GDV246	GDV28 Ftsk Δ C : :arr2 cmR rifR	dif1-dif1	II ; 507 (dif2)	This study
GDV247	GDV28 Δ dif2 Ftsk Δ C : :arr2 cmR rifR	dif1-dif1	II ; 507 (dif2)	This study
GDV252	GDV28 Δ dif1 cmR	dif2-dif2	I ; 1564 (dif1)	This study
GDV257	GDV28 Δ dif1 Δ recA : :aph kmR cmR	dif2-dif2	I ; 1564 (dif1)	This study
GDV278	GDV28 Δ dif2 cmR	dif1-dif1	II ; 507 (dif2)	This study
GDV279	GDV28 Δ dif2 cmR	dif2-dif2	II ; 507 (dif2)	This study
GDV306	GDV28 cmR	dif2-dif2	I ; 1551	This study
GDV308	GDV28 cmR	dif2-dif2	I ; 1543	This study
GDV310	GDV28 cmR	dif2-dif2	I ; 1519	This study
GDV312	GDV28 cmR	dif2-dif2	I ; 1462	This study
GDV314	GDV28 cmR	dif1-dif1	II ; 591	This study
GDV316	GDV28 cmR	dif1-dif1	II ; 498	This study
GDV330	GDV28 Δ dif2 Δ matP : :sh ble zeoR cmR	dif1-dif1	II ; 507 (dif2)	This study
GDV331	GDV28 Δ dif1 cmR	dif2-dif2	I ; 1564 (dif1)	This study
GDV334	GDV28 Δ dif1 Δ recA : :aph kmR cmR	dif2-dif2	I ; 1564 (dif1)	This study
GDV436	GDV28 Δ dif1 Δ dif2 cmR	dif1-dif1	II ; 507 (dif2)	This study
GDV450	GDV28 cmR	dif1-dif1	II ; 659	This study

Name	Relevant genotype or features	Cassette	Position Chr, co- ordinate (kb)	Reference
		Type	Size	
GDV458	GDV28 cmR	dif1-dif1	55bp	II ; 1049
GDV460	GDV28 cmR	dif1-dif1	55bp	II ; 821
GDV471	GDV28 cmR	dif1-dif1	55bp	II ; 312
GDV486	GDV28 Δ dif2 Ftsk Δ C : :arr2 rifR cmR	dif1-dif1	55bp	II ; 507 (dif2)
GDV489	GDV28 Δ dif2 Ftsk Δ C : :arr2 rifR cmR	dif2-dif2	55bp	II ; 507 (dif2)
GDV530	GDV28 Δ matP : :sh ble zeoR cmR	dif1-dif1	55bp	II ; 591
GDV532	GDV28 Δ matP : :sh ble zeoR cmR	dif1-dif1	55bp	II ; 498
GDV534	GDV28 Δ matP : :sh ble zeoR cmR	dif1-dif1	55bp	II ; 659
GDV536	GDV28 Δ matP : :sh ble zeoR cmR	dif1-dif1	55bp	II ; 312
GDV593	GDV28 cmR	dif2-dif2	55bp	I ; 1898
GDV595	GDV28 cmR	dif2-dif2	55bp	I ; 1099
GDV636	GDV28 Δ matP : :sh ble zeoR cmR	dif1-dif1	55bp	II ; 821
GDV642	GDV28 cmR	dif2-dif2	55bp	I ; 1686

3.2.9.2 Supplementary Table 2. List of plasmids

Name	Relevant genotype or features	Reference
pAD21	tet- Sh ble -tet flanked by 2 homologous regions surrounding coordinate II,312kb, oriR6K, cmR zeoR	This study
pAD23	dif1-tet- Sh ble -tet flanked by 2 homologous regions surrounding dif1, oriV, ampR zeoR	This study
pAD24	tet- Sh ble -tet flanked by 2 homologous regions surrounding dif1, oriV, ampR zeoR	This study
pAD30a	dif2- tet- Sh ble -tet flanked by 2 homologous regions surrounding dif2, oriV, ampR zeoR	This study
pAD30b	dif2- tet- Sh ble-tet flanked by 2 homologous regions surrounding dif2, oriV, ampR zeoR	This study
pAD31a	tet- Sh ble -tet flanked by 2 homologous regions surrounding dif2, oriV, ampR zeoR	This study
pAD31b	tet- Sh ble -tet flanked by 2 homologous regions surrounding dif2, oriV, ampR zeoR	This study
pGD135	Transposon, oriR6K, kmR, oriTRP4	This study
pGD162	Sh ble flanked by tet, oriR6K, cmR zeoR	This study
pGD165	1kb dif2-dif2 cassette flanked by tet, oriR6K, cmR	This study
pGD200	pUC18 : : Δ dif1 : :arr2, oriV, rifR ampR	This study
pGD203	27bp dif1-dif1 cassette flanked by tet, oriR6K, cmR	This study
pGD208	27bp dif2-dif2 cassette flanked by tet, oriR6K, cmR	This study
pJB31	pDS132 : : Δ xerC : :araC-xerC-lacI-aadA1, oriR6K, specR, cmR	This study
pMEV69	pDS132 : : Δ lacZ, oriR6K, cmR	This study
pMEV72	pDS132 : : Δ xerC : :aadA1 , oriR6K, specR cmR	This study
pMEV96	pUC18 : : Δ recA : :aph, oriV, kmR ampR	This study
pMEV232	pUC18 : : ftsk Δ C : :arr2, oriV, rifR ampR	This study
pMEV235	pDS132 : : Δ dif2 : :arr2 ,oriR6K, rifR cmR	This study
pMEV245	pDS132 : : Δ xerC : :arr2; oriR6K, rifR cmR	This study
pSH4A	pUC18 : : tet- Sh ble -tet flanked by 2 homologous regions surrounding coordinate I,1551kb, oriV, ampR zeoR	This study
pSH5B	pUC18 : : tet- Sh ble -tet flanked by 2 homologous regions surrounding coordinate I,1543kb, oriV, ampR zeoR	This study
pSH6B	pUC18 : : tet- Sh ble -tet flanked by 2 homologous regions surrounding coordinate I,1519kb, oriV, ampR zeoR	This study

3.2.10 Supplementary References

1. Marvig RL, Blokesch M (2010) Natural transformation of *Vibrio cholerae* as a tool—optimizing the procedure. *BMC Microbiol* 10 : 155
2. O'Toole GA, Kolter R (1998) Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signalling pathways : a genetic analysis. *Mol Microbiol* 28 : 449-461
3. Meibom KL, Blokesch M, Dolganov NA, Wu CY, Schoolnik GK (2005) Chitin induces natural competence in *Vibrio cholerae*. *Science* 310 : 1824-1827

3.2.11 Supplementary Figures

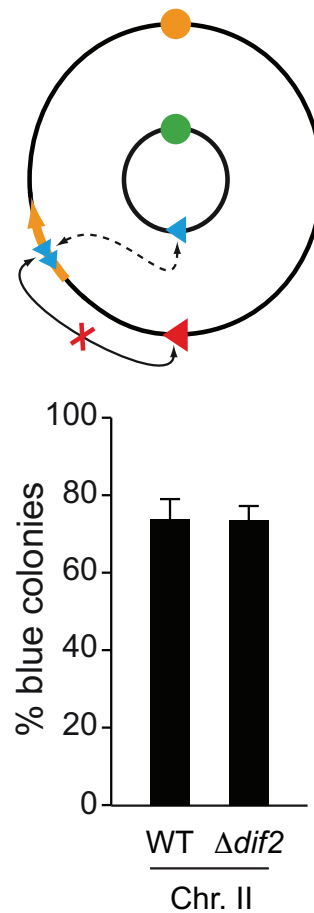


FIGURE 3.5 – **Supplementary Figure 1 : Recombination between *dif* sites harboured on different chromosomes does not perturb the SCC detection** : Schematic representation of the genome of a strain harbouring *lac2dif2* on chI. No intrachromosomal recombination can occur between *lac2dif1* and *dif2* because of sequence incompatibility. The influence of chII *dif2* on chI *lac2dif2* recombination was tested by comparing results obtained in a strain in which *dif2* was deleted. Results from at least three independent experiments. Legends as in Figure 1A.

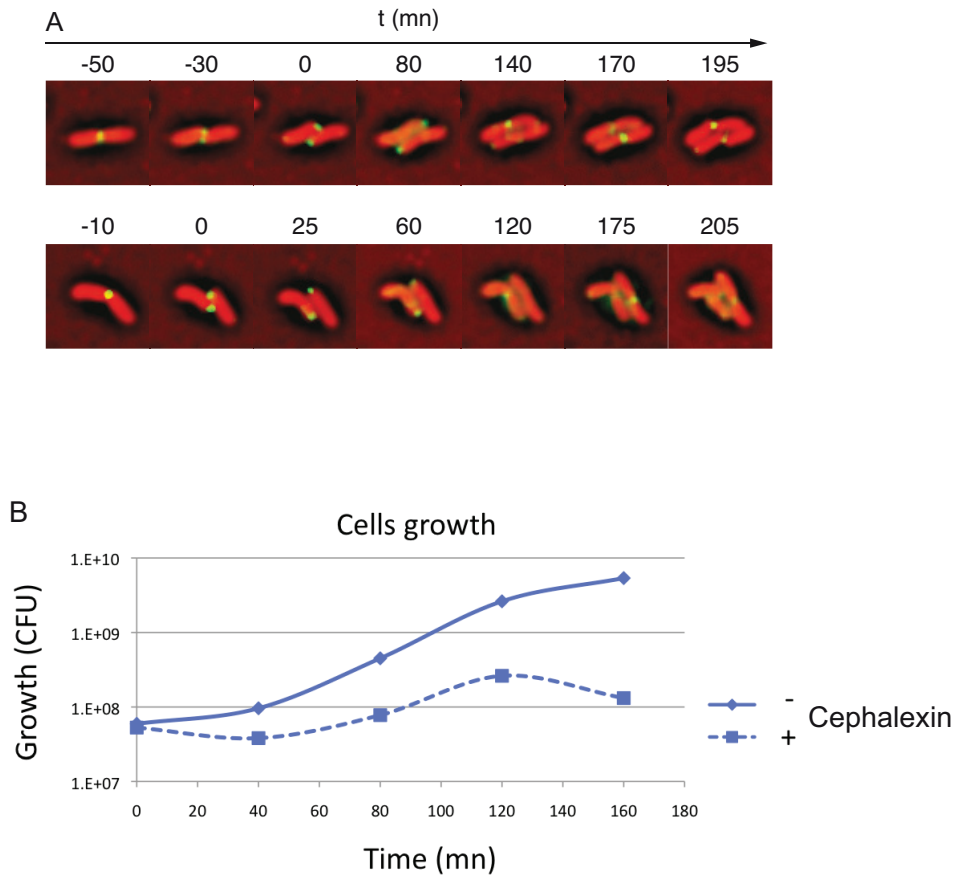


FIGURE 3.6 – **Supplementary Figure 2** : **(A)** FtsK targets to mid-cell prior to cell division. Localization of FtsK-YFP in cells seen by video microscopy. The time before or after the first cell division event is indicated in minutes. **(B)** 2h cephalalexin treatment does not affect *V. cholerae* survival. Cells were grown without (plain line) or with (dashed line) cephalalexin and plate on LB agar plates every 40 mn over 160 mn.

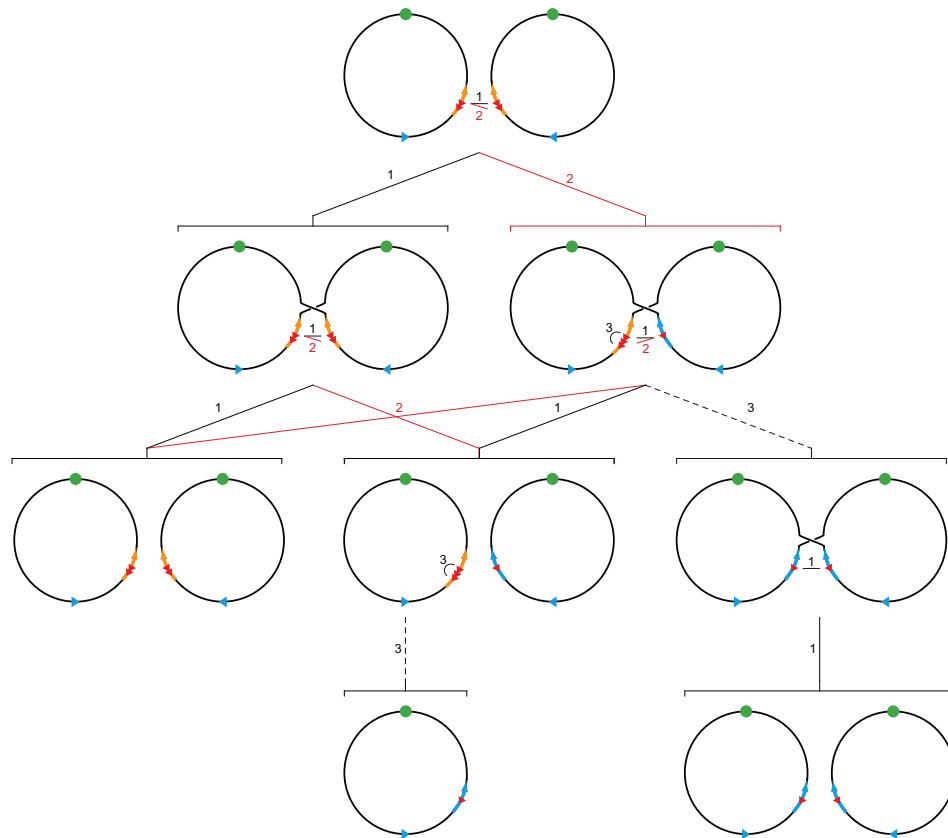


FIGURE 3.7 – **Supplementary Figure 3** : Schematic representation of the possible intermolecular recombination events between *lac2dif2* cassettes harboured on sister chromatide II. The green dot stands for oriII, the blue triangle for *dif2*. The orange arrow represents the *lacZ* gene disrupted by the two *dif* sites (red triangle). The blue arrows show the functional *lacZ* gene after the deletion of the *lac2dif2* cassette.

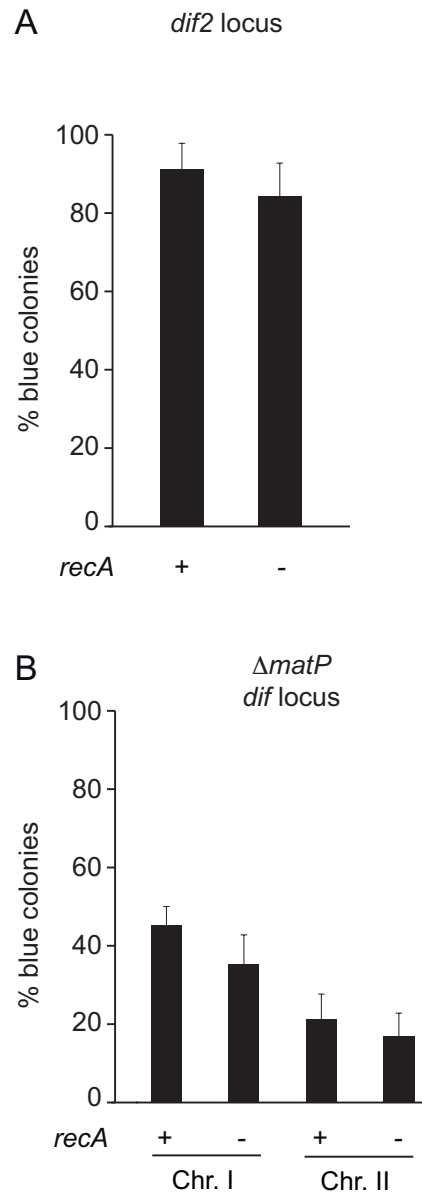


FIGURE 3.8 – **Supplementary Figure 4** : Dimer formation does not influence SCC at the *dif* locus neither in a WT background on ch II (**A**), neither in a $\Delta matP$ background both on chI and chII (**B**). Results from at least three independent experiments.

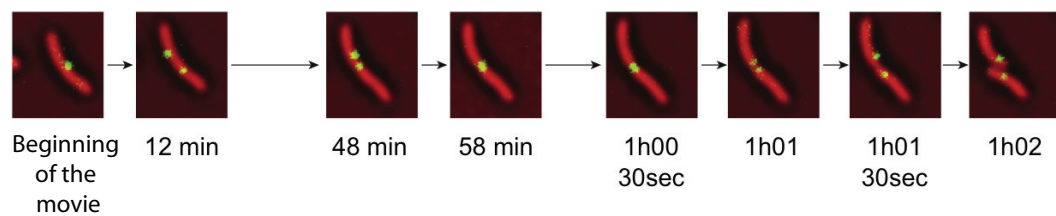


FIGURE 3.9 – **Supplementary Figure 5** : Timelapse of a cell growing in minimal media M9 Fructose-Thiamine : overlay of the phase (red) and the *terII* tagged with *parST1*-ParBT1-yGFP (green). The *TerII* sister chromatids are separated before division but come back together during the last stages of division (4 minutes before division). Only timepoints of interests are shown.

3.3 Discussion

Cette étude a permis grâce à une cassette d'excision, d'estimer la fréquence de contact entre deux chromatides soeurs au moment de la division. Cette cassette d'excision est composée d'un gène *lacZ* perturbé par l'introduction de deux sites *dif*. La fréquence de contact entre les deux chromatides soeurs est mesurée par la reconstitution d'un gène *lacZ* fonctionnel grâce à une recombinaison des sites *dif*, qui n'est activée qu'au septum par FtsK et les protéines Xer. La distance entre les sites *dif* ne permet pas une recombinaison intramoléculaire, donc seul le contact intermoléculaire entre les chromatides soeurs est possible et mesurable. Avec cet essai génétique, il nous a été possible d'observer qu'environ 25% des sites *dif* des chromatides soeurs du chromosome II restaient en contact lors de la division, ce qui est égal aux fréquences de contacts observées pour le chromosome I.

Nous avons ensuite cherché à comprendre les mécanismes qui maintiennent les loci *dif* au septum au moment de la division, pour chacun des chromosomes. Il semble que ça ne soit pas la formation de dimères de chromosomes mais le système MatP/*matS* qui organise ainsi les régions autour des sites *dif*. Ce système caractérisé principalement chez *E. coli*, organise la région autour du terminus de réplication et maintient celle-ci au septum au moment de la division, grâce notamment à une interaction avec la protéine FtsK *via* la protéine ZapB [Mercier *et al.* 2008], [Éspeli *et al.* 2012]. Une délétion du gène de la protéine MatP provoque une modeste mais significative diminution de la fréquence de contact entre les chromatides soeurs du chromosome I. L'effet de cette délétion est beaucoup plus fort pour le chromosome II. Le système MatP/*matS* est capable de relier entre elles des régions éloignées sur la carte du chromosome [Dupaigne *et al.* 2012]. Il est donc possible que ce système crée des liens entre les chromatides soeurs du terminus du chromosome II jusqu'au moment de la division. À notre connaissance, il s'agit du seul système connu qui retarde la séparation des chromatides soeurs jusqu'à ce qu'un certain stade du cycle cellulaire soit atteint.

Mais comment mettre en adéquation ces mesures de fréquences avec nos observations en microscopie de fluorescence qui indiquent le contraire, c'est à dire une séparation précoce des loci *dif* des chromosomes II après réplication ? Les contacts entre chromatides soeurs pourraient être brefs et transitoires, ainsi la faiblesse et la perte de luminosité rapide des fluorophores pourrait empêcher une observation directe de ce phénomène. Peut-être que quelques boucles de caténations seraient maintenues entre les chromatides soeurs par MatP, ce qui n'empêcherait pas la ségrégation de celles-ci. Puis lors de la division, la finalisation de la ségrégation dépendrait de FtsK, qui est capable de détacher MatP de l'ADN [Graham *et al.* 2010]. Ceci expliquerait le pic de recombinaison observé à *dif* pour le chromosome II. A contrario, la colocalisation jusqu'à la division des loci *dif* du chromosome I n'entraîne pas de pic de recombinaison fulgurant. La colocalisation et la cohésion des chromatides soeurs semblent donc être différenciés, ceci a d'ailleurs été observé chez *E. coli* par Lesterlin *et al.* (2012). La délétion de MatP ne provoque que peu de changement dans la cohésion des loci *dif* chromatides soeurs du chromosome I, et chez *E. coli* [Lesterlin *et al.* 2012]. Il

existe donc probablement d'autres mécanismes responsables de la cohésion de la région autour du terminus pour ces deux chromosomes. Il est tentant de penser que ces mécanismes existent dans d'autres espèces ayant le même positionnement du terminus mais pas de système MatP/*matS*, comme *C. crescentus* ou *P. aeruginosa* par exemple.

Dans la plupart des études de ségrégation de chromosome bactérien, l'hypothèse la plus répandue est que c'est l'Origine et sa ségrégation active après réplication qui dirigent le positionnement du reste du chromosome. À l'opposé, le positionnement du terminus est plutôt vu comme étant passif. Notre étude montre que loin d'être passive, la ségrégation du terminus des chromosomes est active et gérée par plusieurs mécanismes redondants. Le terminus du chromosome II de *V. cholerae* semble uniquement géré par le système MatP/*matS*, peut être parce ce chromosome a été acquis récemment. En tant que chromosome, il doit être synchronisé avec le cycle cellulaire, et nous pensons que c'est la raison pour laquelle il a au moins acquis le système MatP/*matS*. Ainsi, FtsK qui joue un rôle majeur dans la décaténation et la ségrégation des termini permet, en interagissant avec le système MatP/*matS*, de synchroniser la ségrégation des termini avec la division cellulaire. FtsK jouerait ainsi le rôle de checkpoint dans le cycle cellulaire. Il est également remarquable de constater que même si les deux chromosomes sont initiés à des moments différents dans le cycle cellulaire, la terminaison de leur réplication est synchrone [Rasmussen *et al.* 2007].

Films de croissance

Sommaire

4.1	Contraintes techniques	123
4.2	Analyse d'un film de croissance	126
4.3	Analyse des timelapses dans le futur	130

4.1 Contraintes techniques

Afin d'affiner notre étude, nous avons décidé de faire des films de croissance des bactéries marquées à différents loci sur leurs chromosome. Le microscope confocal DM6000-B (Leica) utilisé pour les études précédentes ne permet pas de faire de films car les protéines fluorescentes perdent de leur luminosité très rapidement, après 5 images en général. Ceci est dû au fait que l'excitation lumineuse nécessaire à l'activation des protéines est trop forte et trop large (même des fluorophores qui ne sont pas dans le champ sont excités). Il nous a donc fallu acquérir un nouveau microscope, permettant une illumination des fluorophores plus douce et plus précise grâce à un Spinning Disk qui n'illumine l'échantillon que par intermittence. Ainsi, de 5 images, on peut passer à plus d'une centaine de prises de vue.

Traitement des images de BrightField Le microscope utilisé pour faire des films de croissance ne prend pas d'image des cellules en Phase, mais en Bright Field. La Phase est obtenue en créant des interférences entre les rayons lumineux de l'objet observé et un rayon de référence. Ainsi, au focus, on observe nettement les cellules en noir et leur support en blanc. Le Bright Field est la méthode de microscopie la plus simple, où l'on illumine par dessous un échantillon, et on l'observe par dessus. On distingue l'objet car il crée un contraste par absorbance. Mais l'absorbance des bactéries est très proche de celle du gel d'agar sur lequel elles sont déposées, donc au focus, on distingue à peine le contour des cellules (voir figure de comparaison entre les deux techniques, figure 4.2, p.125). Il nous a donc fallu faire une pile d'images, au-dessus et en-dessous de l'échantillon puis une corrélation de cette pile pour obtenir une image exploitable par MicrobeTracker. Cette technique et l'algorithme permettant la corrélation des piles d'images nous ont été aimablement donnés par Vincent Croquette et Nicolas Desprat (École Normale Supérieure à Paris). Les images de fluorescence ont été traitées avec le logiciel Safir permettant d'éliminer le bruit de fond pour une meilleure détection des spots.

Des granules dans les cellules En observant plus en détails les images de Bright Field, nous nous sommes aperçus que des "granules" étaient présents dans les cellules. Ils étaient déjà parfois visibles dans les images de Phase, mais sont devenus beaucoup plus visibles en Bright Field et leur présence crée des artéfacts dans les images que MicrobeTracker détecte comme des cellules divisées. Ils ont un comportement erratique, et nous pensons que ces granules sont des accumulations de polyphosphates (polyP) qui ne semblent pas affecter le positionnement du chromosome. L'utilité de ces granules est encore mal connue, mais ils sont présents chez les eucaryotes et les procaryotes. Chez certaines bactéries, la perte de production de polyP compromet la survie dans des conditions stressantes [Rao *et al.* 2009] et atténue même la virulence de certains pathogènes comme *Mycobacterium tuberculosis* [Sureka *et al.* 2007] et *Pseudomonas aeruginosa* [Rashid *et al.* 2000]. Plusieurs hypothèses ont été formulées : les polyphosphates serviraient de réserve de phosphore essentiel, de stockage d'énergie, de tampon pour les nucléosides triphosphate cytosoliques ou encore de molécule signal favorisant la protéolyse et l'adaptation au stress nutritif. Ainsi, *Vibrio cholerae* développerait en milieu pauvre, des réserves sous formes de granules. L'accumulation de polyphosphates est gérée par le gène *ppk* (pour PolyPhosphate Kinase) et nous avons donc tenté d'enlever ce gène, mais une souche Δppk possède encore des granules. Nous avons donc construit une souche $\Delta hapR$, et cette mutation permet de ne plus avoir de granules dans les cellules, sans affecter la survie des bactéries (voir figure 4.1, p.125).

Maturation des protéines Une nouvelle contrainte s'est présentée à nous lors de l'acquisition des Timelapses : alors qu'il nous était possible de capturer plusieurs centaines d'images de fluorescence à la suite en moins d'une minute, si nous faisons une acquisition toutes les 5 minutes, nous perdions la fluorescence au bout de 60 images, soit environ 5h. Comme cette perte de luminosité n'était pas due à un photobleaching, nous en avons déduit qu'elle devait être due à une mauvaise maturation des protéines fluorescentes. En effet, pour éviter que l'agarose utilisé comme support ne sèche, nous utilisons pour les timelapses un cadre autocollant qui permet de créer une chambre hermétique, mais qui empêche un renouvellement de l'oxygène au cours de l'expérience. Afin de contourner ce problème, nous avons créé un nouveau protocole : au moment du coulage du gel d'agarose, nous créons un canal d'environ 3mm de large dans le gel, afin d'emprisonner une réserve d'oxygène dans la chambre hermétique. Ce canal suffit généralement à avoir une bonne fluorescence au delà des 6h. Nous avons tenté d'autres techniques comme par exemple découper le cadre autocollant afin de créer un canal ouvert sur l'extérieur, mais cette technique est trop aléatoire car cela peut parfois faire sécher l'agarose.

Analyse des images En théorie, MicrobeTracker permet d'analyser des films de croissance de bactéries et ainsi d'avoir la position d'un ou de plusieurs spots dans une cellule au fil du temps, de la naissance de la cellule à sa division. Mais après de nombreux essais infructueux, nous avons conclu que ce n'était pas possible dans

notre cas. En effet, MicrobeTracker n'est pas capable de détecter les divisions des cellules au fil du temps dans des images en Bright Field. Nous avons donc analysé un film de croissance comme si c'était un set d'images n'ayant aucun rapport entre elles. Cette analyse est particulièrement laborieuse, car pour chaque image, il a fallu redessiner le contour des cellules, qui est mal détecté par MicrobeTracker. La détection des spots a ensuite été faite *via* MicrobeTracker, puis nous avons reconstitué la "filiation" de chaque cellule grâce à un programme créé par Leila Muresan, postdoctorante en informatique au laboratoire (exemple de film en figure 4.3, p.126).

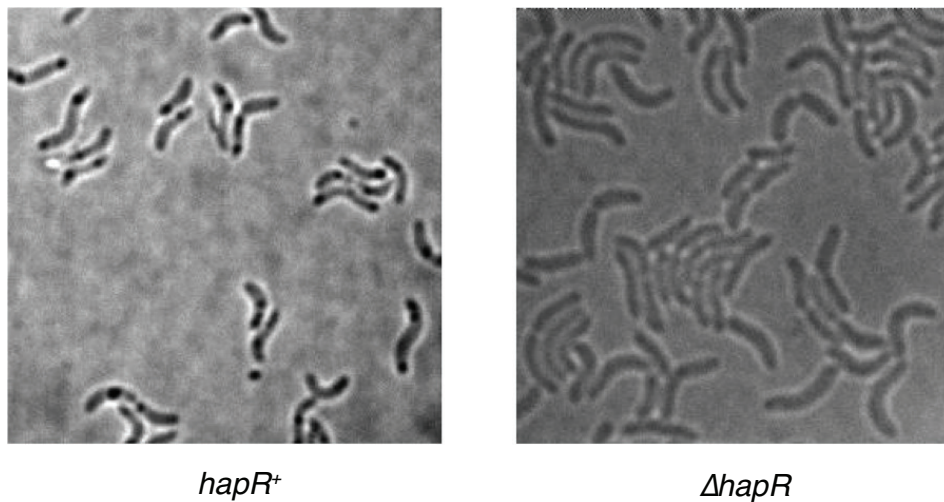


FIGURE 4.1 – Comparaison de souches *hapR+* et $\Delta hapR$;

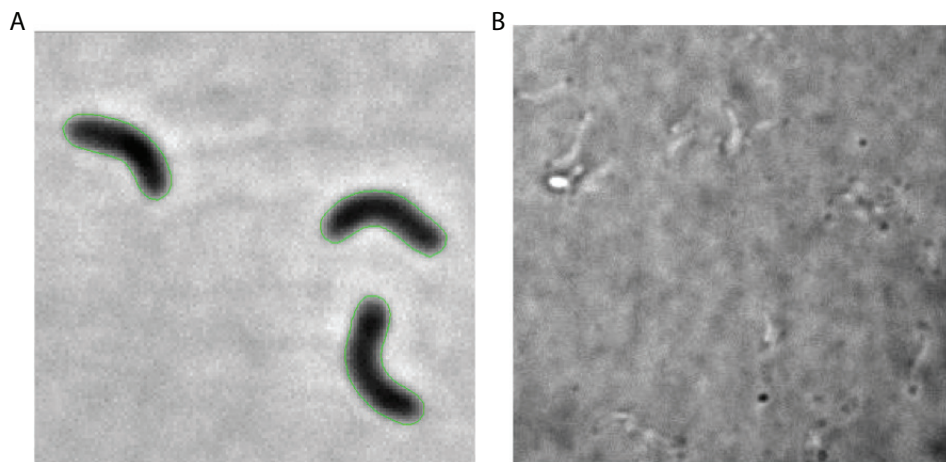


FIGURE 4.2 – Comparaison d'images de Phase et en Bright Field au focus ; **A** : l'image de Phase permet de détecter nettement les cellules, **B** : une image de Bright Field prise au focus ne permet pas de distinguer de contour de cellules

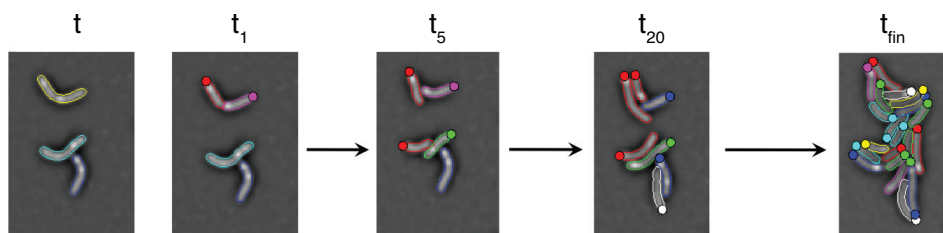


FIGURE 4.3 – Film de croissance analysé ; Exemple de timelapse après traitement et analyse. Différents points de prise de vue sont indiqués. L'orientation des cellules-filles (vieux pôle indiqué avec un cercle), est connue après division.

4.2 Analyse d'un film de croissance

Pour un timelapse de plus de 5h (61 images, 1 image toutes les 5 minutes), nous avons 189 "lignées" de cellules dont on connaît le temps t de naissance et de division. Comme nous avons pu observer leur division, nous connaissons donc leur orientation. La souche étudiée est marquée à oriI par *lacO*-LacI-mcherry et à la position au milieu du réplicore gauche L3I par *parS*-ParBT1-YGFP. Nous avons analysé ce film pour en extraire la position des spots dans les cellules en fonction du temps, à comparer avec les données obtenues avec des images statiques d'une population hétérogène (voir premier article, voir figure 4.4 et 4.5, p.127 et p.128). Les données extraites du film de croissance sont très proches des données extraites d'images statiques. OriI est positionnée au vieux pôle pôle et migre en 25 minutes au nouveau pôle après duplication. La position L3I se situe au centre de la cellule juste après sa naissance, et est ségrégée aux positions $\frac{1}{4}$ $\frac{3}{4}$ après réplication. Nous n'observons pas de lignées avant environ le temps 14, car très de cellules se divisent juste après le début du film. Il faut en général un temps de latence avant que les cellules ne reprennent un cycle cellulaire normal après les avoir déposées sur un gel d'agarose. Nous pouvons également calculer le temps entre la duplication de l'origine du chromosome I et la duplication du milieu du réplicore, qui dans le cas de cette souche est de 14 minutes en moyenne (voir figure 4.6, p.129). Dans un milieu minimum M9 Fructose Thiamine, le cycle cellulaire est de 55 minutes entre deux divisions est divisé en une période B (latence après la division) de 11 minutes, une période C (réplication) de 32 minutes, et d'une période D (latence après la division) de 12 minutes. Pour répliquer le chromosome de l'origine au milieu du réplicore, c'est à dire pour répliquer la moitié du chromosome, il faut donc 16 minutes, et notre estimation est très proche. Ceci implique que soit il n'y a pas de cohésion après réplication des deux loci, soit si il y a cohésion après réplication, qu'il n'y ait pas de différence entre les deux loci.

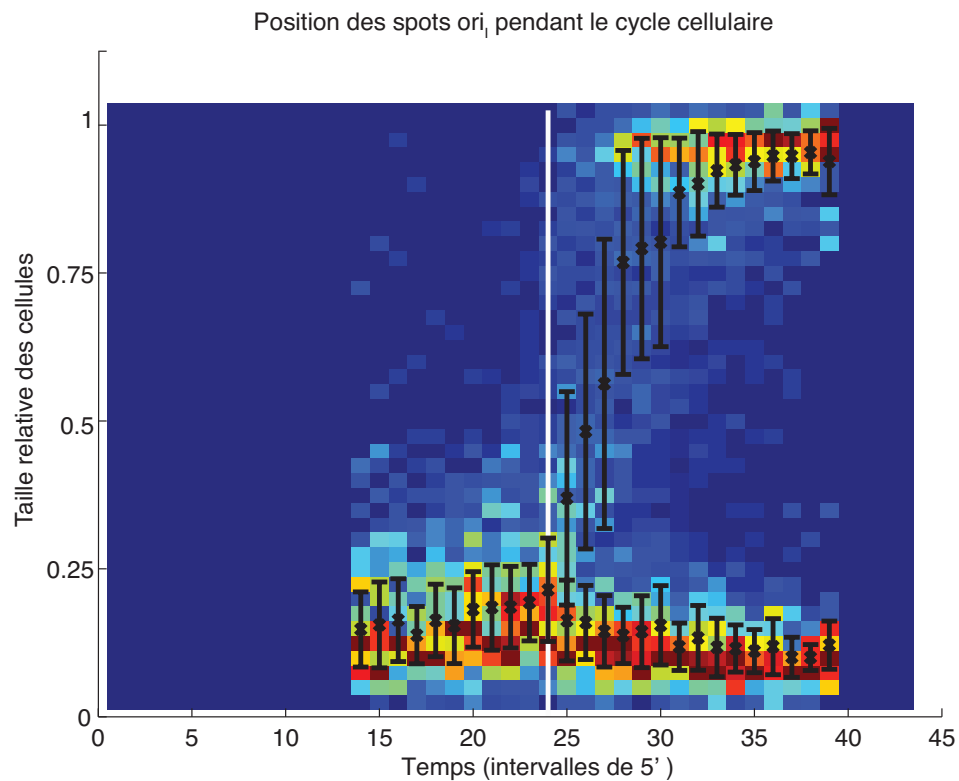


FIGURE 4.4 – Analyse du déplacement des spots oriI au cours du temps ; La position des spots est analysée par catégorie de taille. La fréquence des spots à une position relative dans les cellules est représentée par un gradient de couleur, rouge étant le plus fréquent, bleu le moins. **Barres d'erreurs noires** : médiane, 25^{ème} et 75^{ème} pourcentile. **Trait blanc** : les lignées de cellules sont alignées selon le moment auquel le spot se duplique.

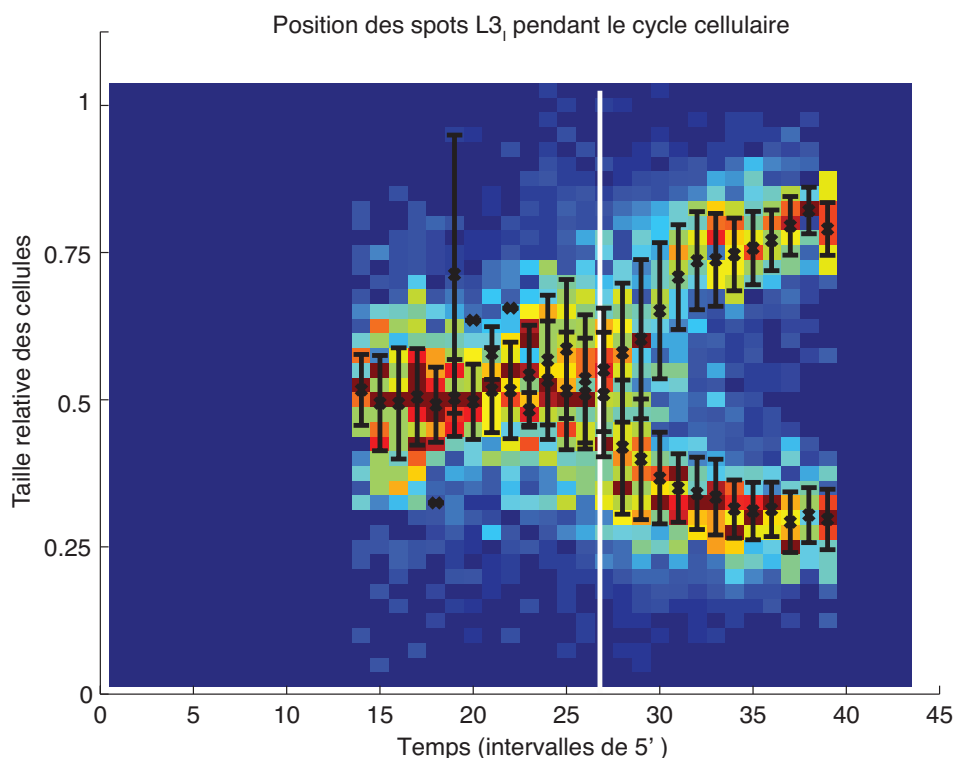


FIGURE 4.5 – Analyse du déplacement des spots $L3_I$ au cours du temps ; La position des spots est analysée par catégorie de taille. La fréquence des spots à une position relative dans les cellules est représentée par un gradient de couleur, rouge étant le plus fréquent, bleu le moins. **Barres d'erreurs noires** : médiane, 25^{ème} et 75^{ème} pourcentile. **Trait blanc** : les lignées de cellules sont alignées selon le moment auquel le spot se duplique.

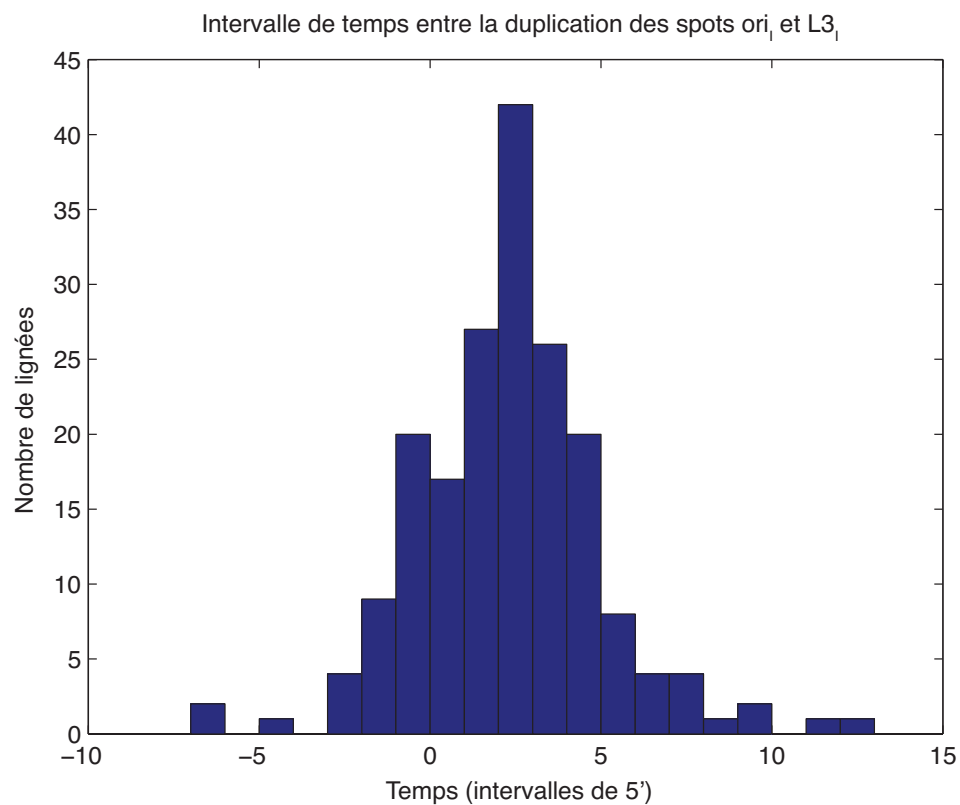


FIGURE 4.6 – Intervalle de temps entre la duplication du spot à l'origine du chromosome I et le spot à un locus au centre d'un réplicore ; Le temps entre la duplication du premier et du deuxième spot est calculée pour chaque lignée cellulaire. L'intervalle de temps le plus fréquent est de $2.7989 * 5 = 14$ minutes

4.3 Analyse des timelapses dans le futur

Analyser des films avec MicrobeTracker s'avère trop contraignant et surtout très long, c'est d'ailleurs pour cela qu'un seul film a été entièrement analysé. Nous sommes donc en train de développer au sein du laboratoire un logiciel fonctionnant sous Matlab mais complètement indépendant de MicrobeTracker. Le principal désavantage de MicrobeTracker était sa lenteur, un nombre de paramètres à régler parfois rebutant (plus de vingt) et surtout pour nos images de Bright Field, un gros problème de segmentation (la capacité à décider quand une cellule est divisée ou non). Pourtant, des images de Bright Field après corrélation possèdent plus d'informations que des images de Phase (voir figure 4.7, p.130). En effet, des images de Phase ne donnent que l'information du contour de la cellule, alors que pour la même cellule observée en pile d'images corrélées en Bright Field, nous avons le contour de la cellule et sa "crête", le point le plus haut de la cellule. En croisant ces informations, il est plus simple de détecter la division des cellules. Ainsi, le nouveau logiciel exploitera mieux les informations des images de cellules.

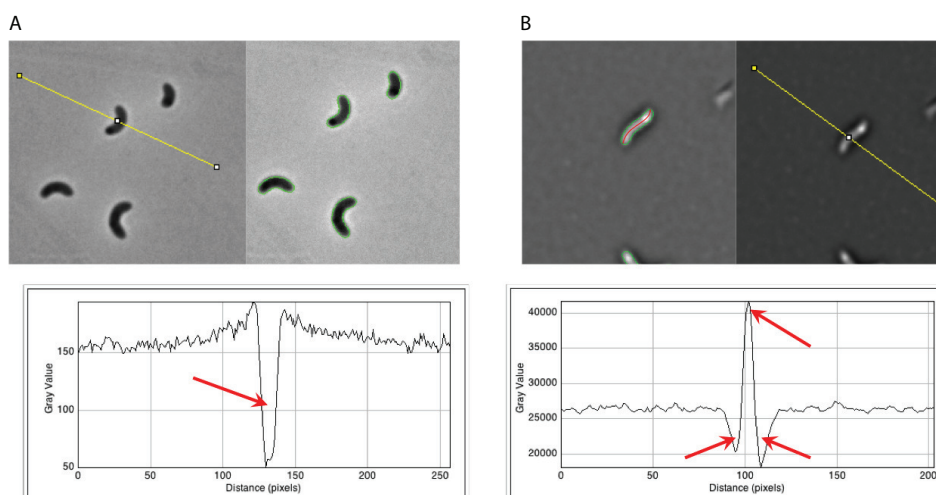


FIGURE 4.7 – Comparaison des images en Phase et en Bright Field ; **A** : image de cellules en Phase et graphique montrant les valeurs de gris de l'image le long du trait jaune coupant la cellule. La cellule est détectée par MicrobeTracker grâce à la baisse de d'intensité de lumière causée par la cellule. **B** : image de cellules en Bright Field après acquisition d'une pile d'images et traitement informatique pour obtenir une image de corrélation. Le traitement permet de retenir des informations que les images de Phase ne permettent pas d'avoir : le contour des cellules est détecté grâce à une baisse de l'intensité lumineuse (halo noir autour des cellules) et la "crête" de la cellule est détectée grâce au pic d'intensité lumineuse dans la cellule. De plus, l'échelle des gris est beaucoup plus grande que pour une image en Phase et permet donc d'être moins tributaires du bruit de fond.

Matériels et Méthodes

Sommaire

5.1	Souches de <i>Vibrio cholerae</i>	131
5.2	Liste des plasmides	137
5.3	Transformation naturelle	138
5.4	Protocoles de Microscopie	138
5.5	Analyse d'images statiques par MicrobeTracker	139

5.1 Souches de *Vibrio cholerae*

Toutes les souches ont été créées par transformation naturelle à partir de la souche N16961. Le plasmide pAD19 a été utilisé pour intégrer par intégration-excision les gènes des protéines fusionnées *LacI-mcherry* et *parBT1-YGFP* à la place du gène *lacZ*. La séquence *parST1-Chloramphénicol* (*parST1-Cm*) servant à marquer le milieu du réplicore droit du chromosome I a été insérée par transformation naturelle à partir de l'ADN génomique de la souche V420. Une banque d'intégration du gène de résistance pour la tétracycline (*Tet*) a été créée par transposition. Pour chaque position d'intérêt, le gène de résistance à la zéocine (*zeo*) a été inséré par intégration-excision du plasmide pGD162 au milieu du gène *Tet*. Pour les positions d'intérêt pour lesquelles nous n'avons pas obtenues de transposon, nous avons construit des plasmides pour insérer Tet'-zeo-'Tet par transformation naturelle au bon endroit. Pour construire toutes les souches marquées à la fois au milieu du réplicore droit du chromosome I par *parST1-ParBT1-GFP* et à une autre position par *lacO-LacImcherry*, après une extraction d'ADN génomique de la souche Tet'-zeo-'Tet, la souche ADV7 a été transformée avec cet ADN génomique. La séquence Tet'-zeo-'Tet a ensuite été remplacée par une séquence Tet'-lacO-Kanamycine - 'Tet via une transformation naturelle avec le plasmide pAD20.

Nom	Construction	Génotype
N16961 ChapR	Laboratoire D.Mazel	N16961 hapR+
ADV1	intégration-excision pGD162 dans ILA1	N16961, Tet'-zeo-'Tet sur ChII (1 048 462 bp)
ADV2	intégration-excision pGD162 dans ILZ27	N16961, Tet'-zeo-'Tet sur ChI (497 861 bp)
ADV3	intégration-excision pGD162 dans ILZ6	N16961, Tet'-zeo-'Tet sur ChI (612 484 bp)
ADV4	N16961 ChapR, intégration-excision de pAD19	N16961 hapR+, lacZ : :lacImcherry-parBT1YGFP
ADV7	ADV4, transformation naturelle ADNg V420	N16961 hapR+, lacZ : :lacImcherry-parBT1YGFP, parST1-Cm ChI (774 401 bp)
ADV8	ADV4, transformation naturelle ADNg V422	N16961 hapR+, lacZ : :lacImcherry-parBT1YGFP, parST1-Cm ChII (0.312 Mb)
ADV9	ADV7, transformation naturelle ADNg ADV2	N16961 hapR+, lacZ : :lacImcherry-parBT1YGFP, parST1-Cm ChI (774 401 bp), Tet'-zeo-'Tet ChI (497 861 bp)
ADV10	ADV7, transformation naturelle ADNg ADV3	N16961 hapR+, lacZ : :lacImcherry-parBT1YGFP, parST1-Cm ChI (774 401 bp), Tet'-zeo-'Tet ChI (612 484 bp)
ADV11	ADV7, transformation naturelle ADNg GVD35	N16961 hapR+, lacZ : :lacImcherry-parBT1YGFP, parST1-Cm ChI (774 401 bp), Tet'-zeo-'Tet ChI (2 087 902 bp)
ADV12	ADV7, transformation naturelle ADNg GDV39	N16961 hapR+, lacZ : :lacImcherry-parBT1YGFP, parST1-Cm ChI (774 401 bp), Tet'-zeo-'Tet ChI (426 568 bp)
ADV13	ADV7, transformation naturelle ADNg GDV40	N16961 hapR+, lacZ : :lacImcherry-parBT1YGFP, parST1-Cm ChI (774 401 bp), Tet'-zeo-'Tet ChI (2 501 730 bp)
ADV14	ADV7, transformation naturelle ADNg GDV41	N16961 hapR+, lacZ : :lacImcherry-parBT1YGFP, parST1-Cm ChI (774 401 bp), Tet'-zeo-'Tet ChI (53 355 bp)
ADV15	ADV7, transformation naturelle ADNg GDV42	N16961 hapR+, lacZ : :lacImcherry-parBT1YGFP, parST1-Cm ChI (774 401 bp), Tet'-zeo-'Tet ChI (2 236 849 bp)

Nom	Constrution	Génotype
ADV16	ADV7, transformation naturelle ADN _g ADV1	N16961 hapR ⁺ , lacZ : :lacImcherry-parBT1YGFP, parST1-Cm ChlI (774 401 bp), Tet ^r -zeo- ^r Tet ChII (1 048 462 bp)
ADV17	ADV8, transformation naturelle ADN _g ADV1	N16961 hapR ⁺ , lacZ : :lacImcherry-parBT1YGFP, parST1-Cm ChlII (0.312 Mb), Tet ^r -zeo- ^r Tet ChII (1 048 462 bp)
ADV18	ADV8 transformation naturelle ADN _g ADV2	N16961 hapR ⁺ , lacZ : :lacImcherry-parBT1YGFP, parST1-Cm ChlII (0.312 Mb), Tet ^r -zeo- ^r Tet ChI (497 861 bp)
ADV19	ADV9, transformation naturelle avec pAD20	N16961 hapR ⁺ , lacZ : :lacImcherry-parBT1YGFP, parST1-Cm ChlI (774 401 bp), lacO-Kan ChlI (497 861 bp)
ADV20	ADV10, transformation naturelle avec pAD20	N16961 hapR ⁺ , lacZ : :lacImcherry-parBT1YGFP, parST1-Cm ChlI (774 401 bp), lacO-Kan ChlI (612 484 bp)
ADV21	ADV11, transformation naturelle avec pAD20	N16961 hapR ⁺ , lacZ : :lacImcherry-parBT1YGFP, parST1-Cm ChlI (774 401 bp), lacO-Kan ChlI (2 087 902 bp)
ADV22	ADV12, transformation naturelle avec pAD20	N16961 hapR ⁺ , lacZ : :lacImcherry-parBT1YGFP, parST1-Cm ChlI (774 401 bp), lacO-Kan ChlI (426 568 bp)
ADV23	ADV13, transformation naturelle avec pAD20	N16961 hapR ⁺ , lacZ : :lacImcherry-parBT1YGFP, parST1-Cm ChlI (774 401 bp), lacO-Kan ChlI (2 501 730 bp)
ADV24	ADV14, transformation naturelle avec pAD20	N16961 hapR ⁺ , lacZ : :lacImcherry-parBT1YGFP, parST1-Cm ChlI (774 401 bp), lacO-Kan ChlI (53 355 bp)
ADV25	ADV15, transformation naturelle avec pAD20	N16961 hapR ⁺ , lacZ : :lacImcherry-parBT1YGFP, parST1-Cm ChlI (774 401 bp), lacO-Kan ChlI (2 236 849 bp)
ADV26	ADV16, transformation naturelle avec pAD20	N16961 hapR ⁺ , lacZ : :lacImcherry-parBT1YGFP, parST1-Cm ChlI (774 401 bp), lacO-Kan ChlI (1 048 462 bp)
ADV27	ADV17, transformation naturelle avec pAD20	N16961 hapR ⁺ , lacZ : :lacImcherry-parBT1YGFP, parST1-Cm ChlII (0.312 Mb), lacO-Kan ChlI (1 048 462 bp)
ADV30	ADV18, transformation naturelle avec pAD20	N16961 hapR ⁺ , lacZ : :lacImcherry-parBT1YGFP, parST1-Cm ChlII (0.312 Mb), lacO-Kan ChlI (497 861 bp)
ADV31	ADV7, transformation naturelle avec ADN _g GDV62	N16961 hapR ⁺ , lacZ : :lacImcherry-parBT1YGFP, parST1-Cm ChlI (774 401 bp), Tet ^r -zeo- ^r Tet ChI (1 897 627 bp)

Nom	Constrution	Génotype
ADV33	ADV31, transformation naturelle avec pAD20	N16961 hapR+, lacZ : :lacImcherry-parBT1YGFP, parST1-Cm ChI (774 401 bp), lacO-Kan ChI (1 897 627 bp)
ADV35	ADV7, transformation naturelle avec pAD24	N16961 hapR+, lacZ : :lacImcherry-parBT1YGFP, parST1-Cm ChI (774 401 bp), Tet'-zeo-'Tet ChI (1 564 103 bp) à côté de dif1
ADV42	ADV35, transformation naturelle avec pAD20	N16961 hapR+, lacZ : :lacImcherry-parBT1YGFP, parST1-Cm ChI (774 401 bp), lacO-Kan ChI (1 564 103 bp) à côté de dif1
ADV44	ADV8, transformation naturelle avec pAD22	N16961 hapR+, lacZ : :lacImcherry-parBT1YGFP, parST1-Cm ChII (0.312 Mb), Tet'-zeo-'Tet ChII (0.821 Mb)
ADV46	ADV44, transformation naturelle avec pAD20	N16961 hapR+, lacZ : :lacImcherry-parBT1YGFP, parST1-Cm ChII (0.312 Mb), lacO-Kan ChII (0.821 Mb)
ADV47	ADV7, transformation naturelle avec pGD167	N16961 hapR+, lacZ : :lacImcherry-parBT1YGFP, parST1-Cm ChI (774 401 bp), Tet'-zeo-'Tet ChI (1 461 502 bp)
ADV48	ADV7, transformation naturelle avec pAD25-1	N16961 hapR+, lacZ : :lacImcherry-parBT1YGFP, parST1-Cm ChI (774 401 bp), Tet'-zeo-'Tet ChI (1 685 991 bp)
ADV50	ADV47, transformation naturelle avec pAD20	N16961 hapR+, lacZ : :lacImcherry-parBT1YGFP, parST1-Cm ChI (774 401 bp), lacO-Kan ChI (1 461 502 bp)
ADV51	ADV48, transformation naturelle avec pAD20	N16961 hapR+, lacZ : :lacImcherry-parBT1YGFP, parST1-Cm ChI (774 401 bp), lacO-Kan ChI (1 685 991 bp)
ADV55	ADV7, transformation naturelle avec pAD30b	N16961 hapR+, lacZ : :lacImcherry-parBT1YGFP, parST1-Cm ChI (774 401 bp), Tet'-zeo-'Tet ChII (506 847 bp) à côté de dif2
ADV56	ADV7, transformation naturelle avec pAD31a	N16961 hapR+, lacZ : :lacImcherry-parBT1YGFP, parST1-Cm ChI (774 401 bp), Tet'-zeo-'Tet ChII (506 847 bp), Δ dif2
ADV57	ADV8, transformation naturelle avec pAD30b	N16961 hapR+, lacZ : :lacImcherry-parBT1YGFP, parST1-Cm ChII (0.312 Mb), Tet'-zeo-'Tet ChII (506 847 bp) à côté de dif2
ADV59	ADV55, transformation naturelle avec pAD20	N16961 hapR+, lacZ : :lacImcherry-parBT1YGFP, parST1-Cm ChI (774 401 bp), lacO-Kan ChII (506 847 bp) à côté de dif2
ADV60	ADV56, transformation naturelle avec pAD20	N16961 hapR+, lacZ : :lacImcherry-parBT1YGFP, parST1-Cm ChI (774 401 bp), lacO-Kan ChII (506 847 bp), Δ dif2

Nom	Constrution	Génotype
ADV61	ADV57, transformation naturelle avec pAD20	N16961 hapR+, lacZ : :lacImcherry-parBT1YGFP, parST1-Cm ChII (0.312 Mb), lacO-Kan ChII (506 847 bp) à côté de dif2
ADV63	ADV4, transformation naturelle avec ADNg ADV26b puis pAD30a	N16961 hapR+, lacZ : :lacImcherry-parBT1YGFP, lacO-Kan ChII (1 048 462 bp), Tet'-zeo-'Tet ChII (506 847 bp) à côté de dif2
ADV64	ADV4, transformation naturelle avec pAD39	N16961 hapR+, lacZ : :lacImcherry-parBT1YGFP, lacO-Kan ChII (1 048 462 bp), parST1-Cm ChII (506 847 bp) à côté de dif2
ADV65	ADV4, transformation naturelle avec ADNg ADV42	N16961 hapR+, lacZ : :lacImcherry-parBT1YGFP, lacO-Kan ChI (1 564 103 bp) à côté de dif1
ADV67	ADV65, transformation naturelle avec ADNg ADV14	N16961 hapR+, lacZ : :lacImcherry-parBT1YGFP, lacO-Kan ChI (1 564 103 bp) à côté de dif1, Tet'-zeo'Tet ChI (53 355 bp)
ADV78	ADV67, transformation naturelle avec pAD39	N16961 hapR+, lacZ : :lacImcherry-parBT1YGFP, lacO-Kan ChI (1 564 103 bp) à côté de dif1, parST1-Cm ChI (53 355 bp)
ADV123	ADV6, transformation naturelle avec ADNg ADV24	N16961 hapR+, lacZ : :lacImcherry-parBT1YGFP, parST1-Cm ChII (0.821 Mb) à côté de dif1, lacO-Kan ChI (53 355 bp)
EPV214	ADV6, transformation naturelle avec ADNg ADV42	N16961 hapR+, lacZ : :lacImcherry-parBT1YGFP FRT-zeo-FRT, parST1-FRT-Cm-FRT ChI (1 023 452 bb) à côté de dif1, lacO-Kan ChI (1 564 103 bp) à côté de dif1

5.2 Liste des plasmides

Nom	Résistances antibiotiques	Génotype
pGD162	Chloramphénicol zéocine	vecteur d'intégration-excision ; SacB ; ori R6K ; cassette Tet'-zeo-'Tet
pAD19	Chloramphénicol	vecteur d'intégration-excision ; SacB ; ori R6K ; YGFP-ParBT1 and LacI-mcherry entre des homologues en amont et en aval du gène <i>lacZ</i> de <i>V. cholerae</i>
pAD20	Chloramphénicol Kanamycine	vecteur d'intégration-excision ; SacB ; ori R6K ; répétition de <i>lacO</i> + KanR entre des homologues Tet
pAD22	Chloramphénicol Zéocine	vecteur d'intégration-excision ; SacB ; cassette Tet'-Zeo-'Tet entre des homologues du milieu du réplicore gauche du chromosome II de <i>V. cholerae</i>
pAD23	Chloramphénicol Ampicilline Zéocine	vecteur d'intégration-excision ; SacB ; ori R6K ; Amont de <i>dif1</i> - dif1 -Tet'-zeo-'Tet-Aval de <i>dif1</i>
pAD24	Chloramphénicol Ampicilline Zéocine	vecteur d'intégration-excision ; SacB ; ori R6K ; Amont de <i>dif1</i> - pas de dif1 -Tet'-zeo-'Tet-Aval de <i>dif1</i>
pAD25	Chloramphénicol Zéocine	vecteur d'intégration-excision ; SacB ; ori R6K ; cassette Tet'-zeo-'Tet entre des zones d'homologies à la droite de <i>dif1</i> at 1,68 Mb (1685991 bp)
pAD30	Ampicilline Zéocine	pUC vector ; Amont de <i>dif2</i> - dif2 -Tet'-zeo-'Tet-Aval de <i>dif2</i>
pAD31	Ampicilline Zéocine	pUC vector ; Amont de <i>dif2</i> - pas de dif2 -Tet'-zeo-'Tet-Aval de <i>dif2</i>
pAD39	Chloramphénicol	vecteur d'intégration-excision ; SacB ; ori R6K ; Tet'-parST1-FRT-CmR-FRT-'Tet

5.3 Transformation naturelle

- J-4 : Les souches réceptrices *Vibrio cholerae* sont striées sur un milieu LB-Agar supplémenté en antibiotiques et incubées pendant la nuit à 37 ° C.
- J-3 : Les souches sont lancées en précultures de 5 mL de LB supplémenté en antibiotiques. Lorsque la culture atteint une Densité Optique (600nm) de ~ 0.6 , 1mL de chaque culture est prélevé et centrifugé à 5000 rpm pendant 10 minutes. Le culot est resuspendu dans 1 mL de milieu M9. Dans un tube contenant de la chitine préalablement stérilisée, on ajoute la culture lavée + 1mL de milieu M9. Le tout est incubé pendant la nuit à 30 ° C.
- J-2 : Le biofilm est centrifugé à 5000rpm pendant 10 min et 1mL de surnageant est remplacé par 1mL de milieu M9 frais. Ajout de l'ADN, sous forme de PCR, plasmidique ou d'ADN génomique sur le biofilm. L'ADN doit contenir des zones d'homologies de chaque côté de la mutation d'intérêt, qui doit elle même être couplée à une résistance à un antibiotique, indispensable pour la sélection. Incubation pendant 3h ou pendant la nuit à 30 ° C.
- J-1 : Vortexage du biofilm et étalement de dilutions de 10^0 à 10^{-3} sur des boîtes LB-agar supplémentés en antibiotique de sélection.
- J : les clones obtenus sont restriés et vérifiés par PCR.

5.4 Protocoles de Microscopie

- J-2 : La souche à observer est striée sur une boîte de Petri LB-agar fraîche supplémentée en antibiotiques et incubée à 37 ° C pendant la nuit.
- J-1 : Une préculture de 5mL en LB + antibiotiques est lancée, incubée à 37 ° C jusqu'à atteindre une Densité Optique (600nm) de 0,6. La culture est diluée à 1/100 dans 5mL de M9 Fructose Thiamine et incubée à 37 ° C jusqu'à atteindre une DO(600nm) de 0,6. La culture est diluée à 1/1000 dans 5mL de M9 Fructose Thiamine et incubée pendant la nuit à 25 ° C.
- J : La culture est diluée à 1/5 dans 5mL de M9 Fructose Thiamine et incubée à 37 ° C jusqu'à atteindre une DO(600nm) de 0,2.

Pour des Snapshots (images statiques) Un gel d'agarose M9 1% est coulé sur une lame de microscopie. 4 μ L de culture sont déposés sur le gel. Après absorption de la culture sur le gel, une lamelle est déposée. La lame est observée avec le microscope DM6000-B (Leica).

Pour des Timelapses (films de croissance) Un Geneframe (Thermo Scientific) est collé sur une lame de microscopie et un gel d'agarose M9 1% est coulé dedans. Une bande de 3mm de large est coupée au milieu du gel d'agarose, de façon à emprisonner de l'air dans un canal lorsque l'on ajoutera la lamelle supérieure. 4 μ L de culture sont déposés sur le gel, le plus proche possible du canal. Ceci est indispensable

pour pouvoir obtenir des films sans perdre de fluorescence au fil du temps. Après absorption de la culture sur le gel, une lamelle est déposée. La lame est observée avec le microscope Axio Observer (Zeiss) couplé à un CSU 1X Spinning Disk, un banc laser d'illumination 497 et 565, et une caméra EMCCD EVOLVE 512 (Roper Scientific), à une température constante de 30 ° C.

5.5 Analyse d'images statiques par MicrobeTracker

MicrobeTracker nous permet d'analyser de façon semi-automatique des images de Phase (pour la détection des contours des cellules) et de fluorescence (pour la localisation des foci). Ainsi, à partir de 10 images statiques de Phase-Fluorescence Rouge-Fluorescence Verte, on obtient les données d'environ 1000 cellules, incluant la taille des cellules et la position des spots dans chaque cellule. Une vérification manuelle est tout de même nécessaire pour corriger les éventuelles erreurs du logiciel. MicrobeTracker fonctionne sous Matlab, qui est à la fois un environnement de développement et un langage de programmation informatique. Il est possible grâce à Matlab, d'extraire les informations calculées par MicrobeTracker et de modéliser des données. La plupart des données des figures ont été obtenues grâce à Matlab.

Courbes de ségrégation des foci Pour obtenir les courbes de ségrégation des foci, chaque souche a été étudiée séparément puis les données obtenues ont été rassemblées. Dans la mesure du possible, chaque locus a été orienté par rapport à un locus dont la position est déjà connue (ori ou ter) et vers le vieux pôle ou le nouveau pôle. Pour chaque souche, les cellules sont séparées en "cellules à 1 focus" et "cellules à 2 foci". Les cellules à 2 foci sont orientées de façon arbitraire de façon à toujours avoir le foci le plus proche d'un pôle au vieux pôle. Les cellules à 1 focus sont orientées en fonction du locus déjà connu ou si ce n'est pas possible, en fonction de l'arrangement dans les cellules à 2 foci : par exemple R4I ne peut pas être orienté avec oriI ou terI car la souche contenant cette position est marquée à L3I et R4I. Dans les cellules à 2 foci de chaque locus, L3I est en majorité vers l'extérieur alors que R4I est plus souvent vers le centre des cellules. Ainsi, on décide d'orienter R4I vers le nouveau pôle. Une fois orientées, les cellules sont classées en fonction de leur taille, dans des classes évoluant de 0.2µm à la fois. Pour chaque classe de taille, la position relative de chaque spot dans chaque cellule est calculée et la médiane de ces positions ainsi que le 25^{ème} et 75^{ème} pourcentile sont calculés. La proportion de cellules à 1 et 2 spots dans la population est calculée (figure 1B du premier papier). Pour chaque classe, on ne représente que les données de la catégorie majoritaire. Ainsi pour les cellules les plus petites, on ne représente que les données des cellules à 1 spot, et pour les cellules les plus grandes proches de la division, on représente en général les données des cellules à 2 spots (figure 1C du premier papier).

Discussion générale

Ces deux études des chromosomes de *Vibrio cholerae* nous informent non seulement sur le positionnement de l'information génétique dans une cellule bactérienne, mais aussi et surtout sur les mécanismes gérant ces deux chorégraphies différentes. Notre étude est basée sur la taille des cellules qui reflète leur stade au cours du cycle cellulaire. Cette méthode a ses avantages, notamment celui d'éviter de faire des timelapses, qui ne sont réalisables que sur des microscopes sophistiqués et analysables que de façon laborieuse, même avec les outils informatiques développés à ce jour qui ont pourtant déjà considérablement facilité le travail des chercheurs s'intéressant à la chorégraphie des chromosomes. L'automatisation de l'analyse permet d'étudier près de 2000 cellules (notre moyenne dans notre étude) par souche marquée. Mais ceci impose une grande régularité dans le contrôle de la croissance des cultures : nous nous sommes aperçus que la taille des cellules et donc les données de duplication tirées de la population varient énormément selon si les cellules sont en phase stationnaire ou en phase exponentielle. De plus, la phase stationnaire est atteinte très rapidement avec *Vibrio cholerae*, c'est à dire dès une Densité Optique (à 600nm) de 0.2 environ. Il a été donc très important de s'assurer que toutes les souches étaient analysées au même stade. Néanmoins, il reste possible que de légères variations dans le timing de ségrégation soient observées face à des données tirées de timelapse.

Le chromosome I a une chorégraphie de type longitudinale, avec son origine ancrée au vieux pôle, les réplichores étirés le long de la cellule et ordonnés de façon séquentielle selon la carte du chromosome et enfin un terminus positionné au nouveau pôle. Pendant la réplication, une des origines répliquées migre au pôle opposé et semble entraîner le reste du chromosome au fil de sa réplication. Le terminus migre rapidement, peut être de façon active, au centre de la cellule et les termini répliqués restent au septum jusqu'à la division. Les loci marqués ne semblent pas se relocaliser tous à un même endroit pour la réplication, ce qui voudrait dire que la machinerie de réplication se déplace le long du chromosome. Il faudrait marquer le réplisome pour vérifier cette hypothèse, mais nos nombreuses tentatives n'ont pas permis d'observer le réplisome par microscopie de fluorescence (essai notamment de marquage de SSB et dnaQ sans succès). La ségrégation séquentielle des foci semble indiquer qu'il n'existe pas de macrodomaines dans le chromosome contrairement à ce qui a été observé chez *E. coli*, dont le chromosome I est très proche. Néanmoins, il nous faudrait plus de loci marqués et une analyse de timelapses courts pour évaluer le mouvement de foci à différentes positions sur le chromosome : le mouvement des foci est plus restreint si le marquage est fait

dans un macrodomaine par rapport à une région non-structurée. Ce travail est en cours et grâce à un nouveau logiciel d'analyse des timelapses, sera plus aisé par rapport à une analyse avec MicrobeTracker.

La chorégraphie du chromosome I semble être en partie orientée par la réplication. Son système de partition, qui semblait être le candidat idéal pour expliquer le positionnement de l'origine au pôle, semble n'avoir qu'un rôle d'ancrage, car une souche ΔparS ou ΔparAB se positionne et se ségrège toujours de la même façon qu'une souche sauvage, à la différence que l'origine semble moins polaire. D'ailleurs, chez *E. coli*, le nucléoïde n'occupe qu'une partie de la cellule, et une délétion de son système MinCDE provoque la formation de mini-cellules, à cause de division aberrantes près des pôles. Chez *Vibrio cholerae*, une délétion du système MinCDE ne provoque aucun changement phénotypique, car le nucléoïde occupe tout l'espace cellulaire et le système SlmA d'Occlusion du Nucléoïde empêche la formation de l'anneau de septation sur l'ADN. Mais si la mutation ΔminCDE est couplée avec une mutation ΔparABS , des mini-cellules vont apparaître, car le désancrage de l'origine au pôle laisse un espace libre pour que l'anneau de septation se forme près d'un pôle (données du laboratoire encore non-publiées). L'utilité du système de partition pour le chromosome I devient ainsi évidente : malgré des systèmes redondants pour éviter des divisions aberrantes, il semble indispensable pour les chromosomes de *Vibrio cholerae* d'occuper tout l'espace cellulaire, et l'ancrage de l'origine au pôle aide à cela. On pourrait probablement dire la même chose du système MatP/*matS* pour le terminus du chromosome I : chez *E. coli*, ce système ancre le terminus au septum jusqu'à la division. Et même si une délétion de ce système n'entraîne pas de phénotype particulier (données du laboratoire non publiées), il est possible que couplée à une délétion du système MinCDE ou SlmA, il nous soit possible d'observer des mini-cellules. Ceci étant dit, il est tout à fait probable que le positionnement au pôle du terminus ne soit pas seulement dû au système MatP/*matS*, puisque ce positionnement est également observé chez des espèces ne possédant pas ce système. Il existe donc peut être un système redondant. Ainsi en occupant tout l'espace cellulaire, le chromosome I de *Vibrio cholerae* prévient des divisions aberrantes, ce qui est une façon de plus de contrôler que la ségrégation et la division soient bien coordonnées.

Le positionnement de l'origine au pôle semble être en partie dû à son timing de réplication : en ajoutant une origine de réplication au milieu d'un réplichore, le positionnement du locus marqué à côté est devenu plus polaire. Ainsi, on peut supposer que c'est peut être la force d'expulsion de la machinerie de réplication ou plus simplement l'encombrement d'ADN dans la cellule qui entraîne cette chorégraphie particulière. La présence du système de partition à côté de l'origine n'est probablement pas un hasard et cela permet de coupler la réplication avec la ségrégation : dans une souche avec des sites *parS* déplacés, un locus à proximité des "nouveaux" *parS* va être plus polaire mais ne va pas être ségrégué plus tôt. La proximité des sites de partition à l'Origine permet pour la cellule de créer une

synergie et s'assurer que la région du chromosome répliquée en premier est ségrégée la première et surtout au point le plus polaire, peut être pour laisser libre la place et ensuite permettre la réplication du reste du chromosome et surtout du chromosome II, qui commence plus tard dans le cycle cellulaire.

Le chromosome II a une chorégraphie de ségrégation qui n'avait jamais été observée auparavant pour un chromosome bactérien : son origine est au centre, les réplichores allongés le long de la cellule et le terminus vers le nouveau pôle, à la position environ au $\frac{3}{4}$ de la cellule, ce qui est différent de toutes les espèces étudiées jusqu'à maintenant, qui ont toutes un terminus au nouveau pôle ou vers le nouveau pôle au bord du nucléoïde pour *Myxococcus xanthus* [Harms *et al.* 2013]. Une étude génétique a permis de montrer que malgré notre observation par microscopie de fluorescence, les termini du chromosome II étaient bien au septum au moment de la division, puisqu'une cassette d'excision ne pouvant être activée que par FtsK au moment de la fermeture du septum, était excisée dans 25% des cas. Ce contact entre chromatides soeurs au septum est en majeure partie dû au système MatP/*matS*, car une souche $\Delta matP$ entraîne une forte diminution de la fréquence de contact entre chromatides soeurs pour le chromosome II (et une diminution discrète mais significative pour le chromosome I). Nous pensons donc que le chromosome II est ramené ou maintenu au septum jusqu'à la division par le système MatP/*matS* et ensuite rejoint une position éloignée du septum, ce qui n'avait jamais été observé auparavant. Ce maintien serait une façon pour la cellule de s'assurer que les deux chromosomes finissent leur ségrégation en même temps, de synchroniser leur cycle entre eux et avec le cycle cellulaire. Si contrairement aux autres chromosomes, le terminus ne reste pas au nouveau pôle après division, c'est peut être parce qu'il n'a pas encore acquis le système (redondant et hypothétique) qui positionne tous les termini de cette façon. Le positionnement du chromosome II est peut être un témoignage de son acquisition récente par l'espèce et de son origine plasmidique. D'ailleurs le positionnement de l'origine de réplication rappelle le positionnement des plasmides d'*E. coli*, dirigé par un système de partition.

Il serait intéressant d'observer plus en détails l'impact de systèmes de positionnement d'un chromosome sur la chorégraphie de l'autre. Pour cela, nous avons marqué le chromosome II en quatre positions différentes (oriII, LII, RII et terII) avec le même marqueur, afin de voir le positionnement de l'ensemble du chromosome II dans différents contextes génétiques et peut être avec d'autres marqueurs sur le chromosome I. Pour une raison inconnue, nous n'avons jamais réussi à obtenir de souche marquée sur le chromosome II dans un contexte $\Delta parS1$ qui ne soit pas malade (problèmes de croissance en milieu minimum ou cellules filamenteuses ou de forme étrange). Si le chromosome I semble peu affecté, il n'en est peut être pas de même pour le chromosome II. De la même façon, peut être que le positionnement des réplichores du chromosome I affecte celui du chromosome II. Les systèmes de partition plasmidiques utilisent le nucléoïde pour ségréger les plasmides et même si cet attachement semble aspécifique quelque soit la séquence d'ADN, ce n'est peut

être pas le cas pour le système de partition du chromosome II. L' ori_{II} est toujours très proche de la position L3_I , plus que la position diamétralement opposée sur la carte du chromosome R2_I et qui a quasi le même positionnement que L3_I pendant le cycle cellulaire (donnée non publiée). Peut être le système de partition du chromosome II a-t-il un point d'ancrage sur le chromosome I? Observer le chromosome II dans une souche où on aurait placé des sites *parSI* à côté de la position L3_I ou R2_I , la rendant plus polaire, pourrait être intéressant.

Vibrio cholerae est ainsi un très bon modèle pour étudier le positionnement de plusieurs chromosomes, car ils ne semblent pas être régulés par les mêmes mécanismes et l'acquisition récente du chromosome II permet de n'étudier que les mécanismes "essentiels" sans risquer d'avoir trop de mécanismes redondants qui empêchent d'étudier les effets d'une simple mutation. Beaucoup d'espèces ayant un génome réparti sur plusieurs chromosomes ont également des mégaplasmides et le chromosome II pourrait servir de modèle pour l'étude des chorégraphies de ségrégation de ces derniers. Ce qui est valable pour un organisme n'est peut être pas valable pour d'autres, mais *V. cholerae* est à la croisée évolutive des espèces principalement étudiées et pourrait permettre de mettre à jour de nouvelles interactions entre les différents systèmes de positionnement ou de compaction, par exemple entre les systèmes de partition et le système SMC.

Bibliographie

- [Abeles *et al.* 1985] A. Abeles, SA. Friedman et SJ. Austin. *Partition of unit-copy mini-plasmids to daughter cells. The DNA sequence and functional organization of the P1 partition region.* J Mol Biol, no. 185, pages 261–272, 1985. (Cité en page 33.)
- [Adams & Errington 2009] DW. Adams et J. Errington. *Bacterial cell division : assembly, maintenance and disassembly of the Z ring.* Nat Rev Microbiol, no. 7, pages 642–653, 2009. (Cité en page 9.)
- [Ali *et al.* 2001] BM. Ali, R. Amit, I. Braslavsky, AB. Oppenheim, O. Gileadi et J. Stavans. *Compaction of single DNA molecules induced by binding of integration host factor (IHF).* Proc Natl Acad Sci USA, no. 98, pages 10658–10663, 2001. (Cité en page 19.)
- [Allardet-Servent *et al.* 1993] A. Allardet-Servent, S. Michaux-Charachon, E. Jumas-Bilak, L. Karayan et M. Ramuz. *Presence of one linear and one circular chromosome in the Agrobacterium tumefaciens C58 genome.* J Bacteriol, no. 175, pages 7869–7874, 1993. (Cité en page 41.)
- [Aussel *et al.* 2002] L. Aussel, FX. Barre, M. Aroyo, A. Stasiak et D. Sherratt. *FtsK is a DNA motor protein that activates chromosome dimer resolution by switching the catalytic state of the XerC and XerD recombinases.* Cell, vol. 2, pages 195–205, 2002. (Cité en pages 8 et 40.)
- [Austin & Austin 2007] B. Austin et DA. Austin. *Bacterial fish pathogens, disease of farmed and wild fish.* Springer Praxis, 2007. (Cité en page 46.)
- [Aylett *et al.* 2010] CH. Aylett, Q. Wang, KA. Michie, LA. Amos et J. Lowe. *Filament structure of bacterial tubulin homologue TubZ.* Proc Natl Acad Sci USA, no. 107, pages 19766–19771, 2010. (Cité en page 34.)
- [Azam *et al.* 1999] T. Ali Azam, A. Iwata, A. Nishimura, S. Ueda et A. Ishihama. *Growth phase-dependent variation in protein composition of the Escherichia coli nucleoid.* J Bacteriol, no. 181, pages 6361–6370, 1999. (Cité en pages 17 et 20.)
- [Badrinarayanan *et al.* 2012] A. Badrinarayanan, R. Reyes-Lamothe, S. Uphoff, M. Leake et D. Sherratt. *In vivo architecture and action of bacterial structural maintenance of chromosome proteins.* Science, no. 338, pages 528–531, 2012. (Cité en page 20.)
- [Bailly *et al.* 1995] C. Bailly, MJ. Waring et AA. Travers. *Effects of base substitutions on the binding of a DNA-bending protein.* J Mol Biol, no. 253, pages 1–7, 1995. (Cité en page 17.)
- [Baker 1955] JR. Baker. *The cell-theory : a restatement, history, and critique. Part V : The multiplication of nuclei.* Q. J. Microsc. Sci., no. 96, pages 449–481, 1955. (Cité en page 13.)

- [Ben-Yehuda & al. 2005] S. Ben-Yehuda et al. *Defining a centromere-like element in Bacillus subtilis by identifying the binding sites for the chromosome-anchoring protein RacA*. Mol Cell, no. 17, pages 773–782, 2005. (Cité en page 43.)
- [Berlitzky et al. 2008] IA. Berlitzky, A. Rouvinski et S. Ben-Yehuda. *Spatial organization of a replicating bacterial chromosome*. Proc Natl Acad Sci USA, no. 105, pages 14136–14140, 2008. (Cité en page 29.)
- [Bernhardt & de Boer 2005] TG. Bernhardt et PA. de Boer. *SlmA, a nucleoid-associated, FtsZ binding protein required for blocking septal ring assembly over chromosomes in E. coli*. Mol Cell, vol. 5, no. 18, pages 555–564, 2005. (Cité en pages 9 et 10.)
- [Bi & Lutkenhaus 1991] EF. Bi et J. Lutkenhaus. *FtsZ ring structure associated with division in Escherichia coli*. Nature, no. 354, pages 161–164, 1991. (Cité en page 9.)
- [Bigot et al. 2005] S. Bigot, OA. Saleh, C. Lesterlin, C. pages, M. El Karoui, C. Dennis, M. Grigoriev, JF. Allemand, FX. Barre et F. Cornet. *KOPS : DNA motifs that control E. coli chromosome segregation by orienting the FtsK translocase*. EMBO J, vol. 21, no. 24, pages 3770–3780, 2005. (Cité en pages 8 et 40.)
- [Blattner et al. 1997] FR. Blattner, G. Plunkett, CA. Bloch et al. *The complete genome sequence of Escherichia coli K-12*. Science, no. 277, pages 1453–1461, 1997. (Cité en page 7.)
- [Bosch et al. 1990] L. Bosch, L. Nilsson, E. Vijgenboom et H. Verbeek. *FIS-dependent trans-activation of trRNA and rRNA operons of Escherichia coli*. Biochim Biophys Acta, no. 1050, pages 293–301, 1990. (Cité en page 17.)
- [Bouet & Funnell 1999] JY. Bouet et B. Funnell. *P1 ParA interacts with the P1 partition complex at parS and an ATP-ADP switch controls ParA activities*. EMBO J, no. 18, pages 1415–1424, 1999. (Cité en page 34.)
- [Bouet et al. 2007] J. Bouet, Y. Ah-Seng, N. Benmeradi et T. Leonard. *Polymérisation of SopA partition ATPase : regulation by DNA binding and SopB*. Mol Microbiol, no. 63, pages 468–481, 2007. (Cité en page 35.)
- [Bowman et al. 2008] GR. Bowman, LR. Comolli, J. Zhu, M. Eckart, M. Koenig, KH. Downing, WE. Moerner, T. Earnest et L. Shapiro. *A polymeric protein anchors the chromosomal origin/ParB complex at a bacterial cell pole*. Cell, no. 134, pages 945–955, 2008. (Cité en page 38.)
- [Bremer & Dennis 1987] H. Bremer et PP. Dennis. *Modulation of chemical composition and other parameters of the cell by growth rate*. In Escherichia coli and Salmonella typhimurium : Cellular and Molecular Biology, pages 1527–1542. F. Neihardt and others. Washington DC : American Society for Microbiology, 1987. (Cité en page 3.)
- [Brézellec et al. 2006] P. Brézellec, M. Hoebeke, MS. Hiet, S. Pasek et JL. Ferat. *DomainSieve : a protein domain-based screen that led to the identification of*

- the dam-associated genes with potential link to DNA maintenance*. Bioinformatics, vol. 16, no. 22, pages 1935–1941, 2006. (Cité en page 45.)
- [Britton *et al.* 1998] RA. Britton, DC. Lin et AD. Grossman. *Characterization of a prokaryotic SMC protein involved in chromosome partitioning*. Genes Dev, no. 12, pages 1254–1259, 1998. (Cité en pages 20 et 39.)
- [Bussiere & Bastia 1999] DE. Bussiere et D. Bastia. *Termination of DNA replication of bacterial and plasmid chromosomes*. Mol Microbiol, no. 31, pages 1611–1618, 1999. (Cité en page 5.)
- [Cassler *et al.* 1995] MR. Cassler, JE. Grimwade et AC. Leonard. *Cell cycle-specific changes in nucleoprotein complexes at a chromosomal replication origin*. EMBO J, no. 14, pages 5833–5841, 1995. (Cité en page 19.)
- [Castaing *et al.* 2008] JP. Castaing, JY. Bouet et D. Lane. *F plasmid partition depends on interaction of SopA with non-specific DNA*. Mol Microbiol, no. 70, pages 1000–1011, 2008. (Cité en page 35.)
- [Cho *et al.* 2011] H. Cho, HR. McManus, SL. Dove et TG. Bernhardt. *Nucleoid occlusion factor SlmA is a DNA-activated FtsZ polymerisation antagonist*. Proc Natl Acad Sci USA, vol. 9, no. 108, pages 3773–3778, 2011. (Cité en page 10.)
- [Claret & Rouviere-Yaniv 1997] L. Claret et J. Rouviere-Yaniv. *Variation in HU composition during growth of Escherichia coli : The heterodimer is required for long term survival*. J Mol Biol, no. 273, pages 93–104, 1997. (Cité en page 20.)
- [Clark & Margulies 1965] AJ. Clark et AD. Margulies. *Isolation and characterization of recombination-deficient mutants of Escherichia coli K12*. PNAS, no. 53, pages 451–459, 1965. (Cité en page 9.)
- [Cui *et al.* 2008] Y. Cui, ZM. Petrushenko et VV. Rybenkov. *MukB acts as a macromolecular clamp in DNA condensation*. Nature Struct Mol Biol, no. 15, pages 411–418, 2008. (Cité en page 20.)
- [Dame & Goosen 2002] RT. Dame et N. Goosen. *HU : Promoting or counteracting DNA compaction*. FEBS Lett, no. 529, pages 151–156, 2002. (Cité en page 19.)
- [Dame *et al.* 2000] RT. Dame, C. Wyman et N. Goosen. *H-NS mediated compaction of DNA visualised by atomic force microscopy*. Nucleic Acids Res, no. 28, pages 3504–3510, 2000. (Cité en page 19.)
- [Dame *et al.* 2001] RT. Dame, C. Wyman et N. Goosen. *Structural basis for preferential binding of H-NS to curved DNA*. Biochimie, no. 83, pages 231–234, 2001. (Cité en page 19.)
- [Dame *et al.* 2002] RT. Dame, C. Wyman, R. Wurm, R. Wagner et N. Goosen. *Structural basis for H-NS-mediated trapping of RNA polymerase in the open initiation complex at the rrnB P1*. J Biol Chem, no. 277, pages 2146–2150, 2002. (Cité en page 19.)

- [Dame 2005] RT. Dame. *The role of nucleoid-associated proteins in the organization and compaction of bacterial chromatin*. Mol Microbiol, vol. 4, no. 56, pages 858–870, 2005. (Cité en page 17.)
- [Danilova *et al.* 2007] O. Danilova, R. Reyes-Lamothe, M. Pinskaya, D. Sherratt et C. Possoz. *MukB colocalizes with the oriC region and is required for organization of the two Escherichia coli chromosome arms into separate cell halves*. Mol Microbiol, vol. 6, no. 65, pages 1485–1492, 2007. (Cité en pages 20 et 39.)
- [Dekker *et al.* 2002] J. Dekker, K. Rippe, M. Dekker et N. Kleckner. *Capturing Chromosome Conformation*. Science, no. 295, pages 1306–1311, 2002. (Cité en page 26.)
- [Delihias & Forst 2001] N. Delihias et S. Forst. *MicF : An antisense RNA gene involved in response of Escherichia coli to global stress*. J Mol Biol, no. 313, pages 1–12, 2001. (Cité en page 20.)
- [Deliuss & Worcel 1974] H. Delius et A. Worcel. *Electron microscopic studies on the folded chromosome of Escherichia coli*. Cold Spring Harb Symp Quant Biol, vol. 38, pages 53–58, 1974. (Cité en page 14.)
- [Demarre & Chattoraj 2010] G. Demarre et DK. Chattoraj. *DNA Adenine Methylation is required to replicate both Vibrio cholerae chromosomes once per cell cycle*. PLoS Genet, no. 6, 2010. (Cité en pages 42, 43 et 48.)
- [DePaola *et al.* 2003] A. DePaola, J. Ulaszek, C.A. Kaysner, B.J. Tenge, J.L. Nordstrom, J. Wells, N. Puhre et S.M. Gendel. *Molecular serological and virulence characteristics of Vibrio parahaemolyticus isolated from environmental, food, and clinical sources in North America and Asia*. Appl Environ Microbiol, no. 69, pages 3999–4005, 2003. (Cité en page 46.)
- [Deshpande & Newlon 1996] AM. Deshpande et CS. Newlon. *DNA replication fork pause sites dependent on transcription*. Science, no. 272, pages 1030–1033, 1996. (Cité en page 7.)
- [Dixon & Kowalczykowski 1991] DA. Dixon et SC. Kowalczykowski. *Homologous pairing in vitro stimulated by the recombination hotspot, Chi*. Cell, no. 66, pages 361–371, 1991. (Cité en page 8.)
- [Dixon & Kowalczykowski 1993] DA. Dixon et SC. Kowalczykowski. *The recombination hotspot, Chi, is a regulatory sequence that acts by attenuating the nuclease activity of the Escherichia coli RecBCD enzyme*. Cell, no. 73, pages 87–96, 1993. (Cité en page 8.)
- [Dubarry *et al.* 2006] N. Dubarry, F. Pasta et D. Lane. *ParABS systems of the four replicons of Burkholderia cenocepacia : new chromosome centromeres confer partition specificity*. J Bacteriol, no. 188, pages 1489–1496, 2006. (Cité en page 43.)
- [Duigou *et al.* 2006] S. Duigou, KG. Knudsen, O. Skovgaard, ES. Egan, A. Lobner-Olesen et MK. Waldor. *Independent control of replication initiation of the two Vibrio cholerae chromosomes by DnaA and RctB*. J Bacteriol, no. 188, pages 6419–6424, 2006. (Cité en pages 42 et 94.)

- [Dunham *et al.* 2009] T. Dunham, W. Xu, B. Funnell et M. Schumacher. *Structural basis for ADP-mediated transcriptional regulation by P1 and P7 ParA*. EMBO J, no. 28, pages 1792–1802, 2009. (Cité en pages 34 et 35.)
- [Dupaigne *et al.* 2012] P. Dupaigne, NK. Tonthat, O. Éspeli, T. Whitfill, F. Boccard et MA. Schumacher. *Molecular basis for a protein-mediated DNA-bridging mechanism that functions in condensation of the E. coli chromosome*. Mol Cell, vol. 4, no. 48, pages 560–571, 2012. (Cité en pages 23 et 120.)
- [Dworkin & Losick 2002] JW. Dworkin et R. Losick. *Does RNA polymerase*. Proc Natl Acad Sci USA, no. 99, pages 14089–14094, 2002. (Cité en page 9.)
- [Ebersbach & Gerdes 2001] G. Ebersbach et K. Gerdes. *The double par locus of virulence factor pB171 : DNA segregation is correlated with oscillation of ParA*. PNAS, no. 98, pages 15078–15083, 2001. (Cité en page 35.)
- [Ebersbach & Gerdes 2004] G. Ebersbach et K. Gerdes. *Bacterial mitosis : partitioning protein ParA oscillates in spiral-shaped structures and positions plasmids at mid-cell*. Mol Microbiol, no. 52, pages 385–398, 2004. (Cité en page 35.)
- [Ebersbach *et al.* 2006] G. Ebersbach, S. Ringgaard, J. Møller-Jensen, Q. Wang, D. Sherratt et K. Gerdes. *Regular cellular distribution of plasmids by oscillating and filament-forming ParA ATPase of plasmid pB171*. Mol Microbiol, no. 61, pages 1428–1442, 2006. (Cité en page 35.)
- [Ebersbach *et al.* 2008] G. Ebersbach, A. Briegel et GJ. Jensen. *A self associating protein critical for chromosome attachment, division and polar organization in caulobacter*. Cell, no. 134, pages 956–968, 2008. (Cité en page 36.)
- [Egan & Waldor 2003] ES. Egan et MK. Waldor. *Distinct replication requirements for the two Vibrio cholerae chromosomes*. Cell, no. 114, pages 521–530, 2003. (Cité en pages 42 et 94.)
- [Engel & von Hippel 1978] JD. Engel et PH. von Hippel. *Effects of methylation on the stability of nucleic acid conformations. Studies at the polymer level*. J Biol Chem, no. 253, pages 927–934, 1978. (Cité en page 43.)
- [Engelhorn *et al.* 1995] M. Engelhorn, F. Boccard, C. Murtin, P. Prentki et J. Geiselmann. *In vivo interaction of the Escherichia coli integration host factor with its specific binding sites*. Nucleic Acids Res, no. 23, pages 2959–2965, 1995. (Cité en page 19.)
- [Éspeli *et al.* 2008] O. Éspeli, R. Mercier et F. Boccard. *DNA dynamics vary according to macrodomain topography in the E. coli chromosome*. Mol Microbiol, no. 68, pages 1418–1427, 2008. (Cité en pages 10, 23 et 32.)
- [Éspeli *et al.* 2012] O. Éspeli, R. Borne, P. Dupaigne, A. Thiel, E. Gigant, R. Mercier et F. Boccard. *A MatP-divisome interaction coordinates chromosome segregation with cell division in E. coli*. EMBO J, vol. 14, no. 31, pages 3198–3211, 2012. (Cité en pages 23, 40, 44, 90, 91, 94 et 120.)

- [Fiebig *et al.* 2006] A. Fiebig, K. Keren et J. Theriot. *Fine-scale timelapse analysis of the biphasic, dynamic behaviour of the two Vibrio cholerae chromosomes.* Mol Microbiol, no. 60, pages 1164–1178, 2006. (Cité en page 33.)
- [Filutowicz & Inman 1995] M. Filutowicz et R. Inman. *A compact nucleoprotein structure is produced by binding of Escherichia coli integration host factor (IHF) to the replication origin of plasmid R6K.* J Biol Chem, no. 266, pages 24077–24083, 1995. (Cité en page 19.)
- [Fogel & Waldor 2006] M.A. Fogel et M.K. Waldor. *A dynamic, mitotic-like mechanism for bacterial chromosome segregation.* Genes Dev, no. 20, pages 3269–3282, 2006. (Cité en pages 34, 35, 38 et 43.)
- [Francino & Ochman 1997] M.P. Francino et H. Ochman. *Strand asymmetries in DNA evolution.* Trends Genet, no. 13, pages 240–245, 1997. (Cité en page 7.)
- [Frank & Lobry 1999] A.C. Frank et J.R. Lobry. *Asymmetric patterns : a review of possible underlying mutational or selective mechanisms.* Gene, no. 238, pages 65–77, 1999. (Cité en page 8.)
- [French 1992] S. French. *Consequences of replication fork movement through transcription units in vivo.* Science, no. 258, pages 1362–1365, 1992. (Cité en page 7.)
- [Garcia-Russell *et al.* 2004] N. Garcia-Russell, T.G. Harmon, T.Q. Le, N.H. Amaladas, R.D. Mathewson et A.M. Segall. *Unequal access of chromosomal regions to each other in Salmonella : Probing chromosome structure with phage λ integrase-mediated long-range rearrangements.* Mol Microbiol, no. 52, pages 329–344, 2004. (Cité en page 21.)
- [Gellert *et al.* 1976] M. Gellert, M.H. O’Dea, T. Itoh et J. Tomizawa. *Novobiocin and coumermycin inhibit DNA supercoiling catalyzed by DNA gyrase.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, no. 73, pages 4474–4478, 1976. (Cité en page 14.)
- [Gellert *et al.* 1977] M. Gellert, K. Mizuuchi, M.H. O’Dea, T. Itoh et J. Tomizawa. *Nalidixic acid resistance : a second genetic character involved in DNA gyrase activity.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, no. 74, pages 4772–4776, 1977. (Cité en page 14.)
- [Gerdes *et al.* 2000] K. Gerdes, J. Møller-Jensen et R. Jensen. *Plasmid and chromosome partitioning : surprises from phylogeny.* Mol Microbiol, no. 37, pages 455–466, 2000. (Cité en page 34.)
- [Gerdes *et al.* 2010] K. Gerdes, M. Howard et F. Szardenings. *Pushing and pulling in prokaryotic DNA segregation.* Cell, no. 141, pages 927–942, 2010. (Cité en page 34.)
- [Glover & McHenry 2001] B.P. Glover et C.S. McHenry. *The DNA Polymerase III holoenzyme : an asymmetric dimeric replicative complex with leading and lagging strand polymerases.* Cell, no. 105, pages 925–934, 2001. (Cité en page 5.)

- [Goosen & van de Putte 1995] N. Goosen et P. van de Putte. *The regulation of transcription initiation by integration host factor*. Mol Microbiol, no. 16, pages 1–7, 1995. (Cité en page 19.)
- [Graham *et al.* 2010] JE. Graham, V. Sivanathan, DJ. Sherratt et LK. Arciszewska. *FtsK translocation on DNA stops at XerCD-dif*. Nucleic Acid Res, no. 38, pages 72–81, 2010. (Cité en page 120.)
- [Graumann *et al.* 1998] PL. Graumann, R. Losick et AV. Strunnikov. *Subcellular localization of Bacillus subtilis SMC, a protein involved in chromosome condensation and segregation*. J Bacteriol, no. 180, pages 5749–5755, 1998. (Cité en page 20.)
- [Grigoriev 1998] A. Grigoriev. *Analyzing genomes with cumulative skew diagrams*. Nucleic Acid Res, no. 26, pages 2286–2290, 1998. (Cité en page 7.)
- [Gruber & Errington 2009] S. Gruber et J. Errington. *Recruitment of condensin to replication origin regions by ParB/SpoOJ promotes chromosome segregation in B. subtilis*. Cell, no. 137, pages 685–696, 2009. (Cité en page 39.)
- [Harms *et al.* 2013] A. Harms, A. Treuner-Lange, D. Schumacher et L. Sogaard-Andersen. *Tracking of Chromosome and Replisome Dynamics in Myxococcus xanthus Reveals a Novel Chromosome Arrangement*. PLOS Genet, vol. 9, no. 9, 2013. (Cité en page 143.)
- [Hatano *et al.* 2007] T. Hatano, Y. Yamaichi et H. Niki. *Oscillating focus of SopA associated with filamentous structure guides partitioning of F plasmid*. Mol Microbiol, no. 64, pages 1198–1213, 2007. (Cité en page 34.)
- [Heidelberg *et al.* 2000] JF. Heidelberg, JA. Eisen, WC. Nelson et al. *DNA sequence of both chromosomes of the cholera pathogen Vibrio cholerae*. Nature, no. 406, pages 477–483, 2000. (Cité en pages 33, 41, 42, 45, 48, 91 et 94.)
- [Henson & Kuempel 1985] JM. Henson et PL. Kuempel. *Deletion of the terminus region (340 kbp of DNA) from the chromosome of Escherichia coli*. Proc Natl Acad Sci USA, no. 82, pages 3766–3770, 1985. (Cité en page 5.)
- [Hester & Lutkenhaus 2007] CM. Hester et J. Lutkenhaus. *Soj (ParA) DNA binding is mediated by conserved arginines and is essential for plasmid segregation*. Proc Natl Acad Sci USA, no. 104, pages 20326–20331, 2007. (Cité en page 35.)
- [Hirano & Hirano 2002] M. Hirano et T. Hirano. *Hinge-mediated dimerization of SMC protein is essential for its dynamic interaction with DNA*. EMBO J, no. 21, pages 5733–5744, 2002. (Cité en page 20.)
- [Hirano *et al.* 2001] M. Hirano, DE. Anderson, HP. Erickson et T. Hirano. *Bimodal activation of SMC ATPase by intra- and intermolecular interactions*. EMBO J, no. 20, pages 3238–3250, 2001. (Cité en page 20.)
- [Hirano 2006] T. Hirano. *At the heart of the chromosome : SMC proteins in action*. Nature Rev. Mol. Cell Biol., no. 7, pages 311–322, 2006. (Cité en page 20.)

- [Hirvonen *et al.* 2001] CA. Hirvonen, W. Ross, CE. Wozniak, E. Marasco, JR. Anthony, SE. Aiyar, VH. Newburn et RL Gourse. *Contribution of UP elements and the transcription factor FIS to expression from the seven rrn P1 promoters in Escherichia coli*. J Bacteriol, no. 183, pages 6305–6314, 2001. (Cité en page 17.)
- [Hommais *et al.* 2001] F. Hommais, E. Krin, C. Laurent-Winter, O. Soutourina, A. Malpertuy, JP. Le Caer, A. Danchin et P. Bertin. *Large-scale monitoring of pleiotropic regulation of gene expression by the prokaryotic nucleoid-associated protein, H-NS*. Mol Microbiol, no. 40, pages 20–36, 2001. (Cité en page 19.)
- [Hu *et al.* 2002] Z. Hu, EP. Gogol et J. Lutkenhaus. *Dynamic assembly of MinD on phospholipid vesicles regulated by ATP and MinE*. Proc Natl Acad Sci USA, no. 99, pages 6761–6766, 2002. (Cité en pages 9 et 10.)
- [Huang *et al.* 2003] KC. Huang, Y. Meir et NS. Wingreen. *Dynamic structures in Escherichia coli : spontaneous formation of MinE rings and MinD polar zones*. Proc Natl Acad Sci USA, no. 100, pages 12724–12728, 2003. (Cité en page 36.)
- [Hui *et al.* 2010] M. Hui, V. Galkin, X. Yu, A. Stasiak, M. Waldor et E. Egelman. *ParA2, a Vibrio cholerae chromosome partitioning protein, forms left-handed helical filaments on DNA*. PNAS, no. 107, pages 4590–4595, 2010. (Cité en page 35.)
- [Huys *et al.* 2001] L. Huys, P. Dhert, R. Robles, F. Ollevier, P. Sorgeloos et J. Swings. *Search for beneficial bacterial strains for turbot (Scophthalmus maximus L.) larviculture*. Aquaculture, no. 193, pages 25–37, 2001. (Cité en page 46.)
- [Iisma & Wake 1987] TP. Iisma et RG. Wake. *The normal replication terminus of the Bacillus subtilis chromosome, terC, is dispensable for vegetative growth and sporulation*. J Mol Biol, no. 195, pages 299–310, 1987. (Cité en page 5.)
- [Ireton *et al.* 1994] K. Ireton, NW. Gunther et AD. Grossman. *spoOJ is required for normal chromosome segregation as well as the initiation of sporulation in Bacillus subtilis*. J Bacteriol, no. 176, pages 5320–5329, 1994. (Cité en pages 33 et 38.)
- [Jacob *et al.* 1963] F. Jacob, S. Brenner et F. Cuzin. *On the regulation of DNA replication in bacteria*. Cold Spring Harb Symp Quant Biol, no. 28, pages 329–348, 1963. (Cité en page 33.)
- [Jensen & Shapiro 1999] RB Jensen et L. Shapiro. *The Caulobacter crescentus smc gene is required for cell cycle progression and chromosome segregation*. Proc Natl Acad Sci USA, no. 96, pages 10661–10666, 1999. (Cité en pages 20 et 39.)
- [Jensen & Shapiro 2003] RB. Jensen et L. Shapiro. *Cell-cycle-regulated expression and subcellular localization of the Caulobacter crescentus SMC chromosome*

- structural protein*. J Bacteriol, no. 185, pages 3068–3075, 2003. (Cité en page 20.)
- [Jha *et al.* 2012] JK. Jha, G. Demarre, T. Venkova-Canova et DK. Chattoraj. *Replication regulation of Vibrio cholerae chromosome II involves initiator binding to the origin both as monomer and as dimer*. Nucleic Acids Res, no. 40, pages 6026–6038, 2012. (Cité en page 42.)
- [Joshi *et al.* 2011] MC. Joshi, A. Bourniquel, J. Fisher, BT. Ho, D. Magnan, N. Kleckner et D. Bates. *Escherichia coli sister chromosome separation includes an abrupt global transition with concomitant release of late-splitting intersister snaps*. Proc Natl Acad USA, no. 108, pages 2765–2770, 2011. (Cité en page 38.)
- [Joshi *et al.* 2013] MC. Joshi, D. Magnan, TP. Montminy, M. Lies, N. Stepankiw et D. Bates. *Regulation of sister chromosome cohesion by the replication fork tracking protein SeqA*. PLoS Genet, vol. 8, no. 9, 2013. (Cité en page 38.)
- [Kadoya *et al.* 2011] R. Kadoya, JH. Baek, A. Sarker et DK. Chattoraj. *Participation of chromosome segregation protein parA1 of Vibrio cholerae in chromosome replication*. J Bacteriol, no. 193, pages 1504–1514, 2011. (Cité en page 44.)
- [Kahng & Shapiro 2003] LS. Kahng et L. Shapiro. *Polar localization of replicon origins in the multipartite genomes of Agrobacterium tumefaciens and Sinorhizobium meliloti*. J Bacteriol, no. 185, pages 3384–3391, 2003. (Cité en pages 43 et 44.)
- [Karlin 1999] S. Karlin. *Bacterial DNA strand compositional asymmetry*. Trends Microbiol, no. 7, pages 305–308, 1999. (Cité en page 7.)
- [Kasmashev *et al.* 1999] D Kasmashev, A Balandina et J Rouviere-Yaniv. *The binding motif recognized by HU on both nicked and cruciform DNA*. EMBO J, no. 18, pages 5434–5444, 1999. (Cité en page 19.)
- [Kavenoff & Ryder 1976] R. Kavenoff et OA. Ryder. *Electron Microscopy of membrane associated folded chromosomes from Escherichia coli*. Chromosoma, vol. 55, pages 13–25, 1976. (Cité en page 14.)
- [Kelly *et al.* 2004] A. Kelly, MD. Goldberg, RK. Carrol, V. Danino, JC. Hinton et CJ Dorman. *A global role for Fis in the transcriptional control of metabolism and type III secretion in Salmonella enterica serovar typhimurium*. Microbiology, no. 150, pages 2037–2053, 2004. (Cité en page 17.)
- [Kitani *et al.* 1985] T. Kitani, K. Yoda, T. Ogawa et T. Okazaki. *Evidence that discontinuous DNA replication in Escherichia coli is primed by approximately 10 to 12 residues of RNA strating with a purine*. J Mol Biol, no. 184, pages 45–52, 1985. (Cité en page 6.)
- [Kruse *et al.* 2007] K. Kruse, M. Howard et W. Margolin. *An experimentalist's guide to computational modeling of the Min system*. Mol Microbiol, no. 63, pages 1279–1284, 2007. (Cité en page 10.)

- [Kuzminov 2011] A. Kuzminov. *DNA replication meets genetic exchange : chromosomal damage and its repair by homologous recombination*. Proc Natl Acad Sci USA, no. 98, pages 8461–8468, 2011. (Cité en page 7.)
- [Lackner et al. 2003] LL. Lackner, DM. Raskin et PA. de Boer. *ATP-dependent interactions between Escherichia coli Min proteins and the phospholipid membrane in vitro*. J Bacteriol, no. 185, pages 735–749, 2003. (Cité en page 10.)
- [Lam et al. 1974] ST. Lam, MM. Stahl, KD. McMilin et FW. Stahl. *Rec-mediated recombinational hot spot activity in bacteriophage lambda. II. A mutation which causes hot spot activity*. Genetics, no. 77, pages 425–433, 1974. (Cité en page 8.)
- [Lam et al. 2006] H. Lam, W. Schofield et C. Jacobs-Wagner. *A landmark protein essential for establishing and perpetuating the polarity of a bacterial cell*. Cell, no. 124, pages 1011–1023, 2006. (Cité en page 38.)
- [Lau et al. 2003] IF. Lau, SR. Filipe, B. S balle, OA.  kstad, FX. Barre et D. Sherratt. *Spatial and temporal organization of replicating Escherichia coli chromosomes*. Mol Microbiol, vol. 3, no. 49, pages 731–743, 2003. (Cité en pages 24 et 38.)
- [Leonard et al. 2005] TA. Leonard, PJ. Butler et J. Lowe. *Bacterial chromosome segregation : structure and DNA binding of the Soj dimer, a conserved biological switch*. EMBO J, no. 24, pages 270–282, 2005. (Cité en page 35.)
- [Lesterlin et al. 2012] C. Lesterlin, E. Gigant, F. Boccard et O. Espeli. *Sister chromatid interactions in bacteria revealed by a site-specific recombination assay*. EMBO J, no. 31, pages 3468–3479, 2012. (Cité en page 120.)
- [Lewis et al. 2002] RA. Lewis, CR. Bignell, W. Zeng, AC. Jones et CM. Thomas. *Chromosome loss from par mutants of Pseudomonas putida depends on growth medium and phase of growth*. Microbiology, no. 148, pages 537–548, 2002. (Cité en page 38.)
- [Li et al. 2002] Y. Li, K. Sergueev et S. Austin. *The segregation of the Escherichia coli origin and terminus of replication*. Mol Microbiol, no. 46, pages 985–996, 2002. (Cité en page 38.)
- [Lieberman-Aiden et al. 2009] E. Lieberman-Aiden, NL. van Berkum, L. Williams, M. Imakaev, T. Ragoczy, A. Telling, I. Amit, BR. Lajoie, PJ. Sabo, MO. Dorschner, R. Sandstrom, B. Bernstein, MA. Bender, M. Groudine, A. Gnirke, J. Stamatoyannopoulos, LA. Mirny ans ES. Lander et J. Dekker. *Comprehensive mapping of long-range interactions reveals folding principles of the human genome*. Science, no. 326, pages 289–293, 2009. (Cité en page 26.)
- [Lin & Grossman 1998] DC. Lin et AD. Grossman. *Identification and characterization of a bacterial chromosome partitioning site*. Cell, no. 92, pages 675–685, 1998. (Cité en pages 9 et 33.)
- [Lindow et al. 2002] JC. Lindow, M. Kuwano, S. Moriya et AD. Grossman. *Subcellular localization of hte Bacillus subtilis structural maintenance of chromo-*

- somes (SMC) protein*. Mol Microbiol, no. 46, pages 997–1009, 2002. (Cité en page 20.)
- [Liu & Sanderson 1996] SL. Liu et KE. Sanderson. *Highly plastic chromosomal organization in Salmonella typhi*. Proc Natl Acad Sci USA, no. 93, pages 10303–10308, 1996. (Cité en page 5.)
- [Livny et al. 2007] J. Livny, Y. Yamaichi et MK. Waldor. *Distribution of centromère-like parS sites in bacteria : insights from comparative genomics*. J Bacteriol, no. 189, pages 8693–8703, 2007. (Cité en pages 33 et 48.)
- [Lobner-Olesen et al. 1994] A. Lobner-Olesen, FG. Hansen, KV. Rasmussen, B. Martin et PL. Kuempel. *The initiation cascade for chromosome replication in wild-type and Dna methyltransferase deficient Escherichia coli cells*. EMBO J, no. 13, pages 1856–1862, 1994. (Cité en page 43.)
- [Lobner-Olesen et al. 2005] A. Lobner-Olesen, O. Skovgaard et MG. Marinus. *Dam methylation : coordinating cellular processes*. Curr Opin Microbiol, no. 8, pages 154–160, 2005. (Cité en page 42.)
- [Lobry 1996] JR. Lobry. *Asymmetric substitution patterns in the two DNA strands of bacteria*. Mol Biol Evol, no. 13, pages 660–665, 1996. (Cité en page 7.)
- [Loose et al. 2011] M. Loose, E. Fisher-Friedrich, C. Herold, K. Kruse et P. Schwill. *Min protein patterns emerge from rapid rebinding and membrane interaction of MinE*. Nat Struct Mol Biol, no. 18, pages 577–583, 2011. (Cité en page 36.)
- [Louarn et al. 1985] JM. Louarn, JP. Bouche, F. Legendre, J. Louarn et J. Patte. *Characterization and properties of very large inversions of the E. coli chromosome along the origine-to-terminus axis*. Mol Gen Genet, no. 201, pages 467–476, 1985. (Cité en page 5.)
- [Lu et al. 1994] M. Lu, JL. Campbell, E. Boye et N. Kleckner. *SeqA : a negative modulator of replication initiation in E. coli*. Cell, vol. 3, no. 77, pages 413–426, 1994. (Cité en page 38.)
- [Lutkenhaus 2007] J. Lutkenhaus. *Assembly dynamics of the bacterial MinCDE system and spatial regulation of the Z ring*. Annu Rev Biochem, no. 76, pages 539–562, 2007. (Cité en pages 9 et 36.)
- [Manna & Gowrishankar 1994] D. Manna et J. Gowrishankar. *Evidence for involvement of proteins HU and RpoS in transcription of the osmoresponsive proU operon in Escherichia coli*. J Bacteriol, no. 176, pages 5378–5384, 1994. (Cité en page 20.)
- [Margolin 2005] W. Margolin. *FtsZ and the division of prokaryotic cells and organelles*. Nat Rev Mol Cell Biol, vol. 11, no. 6, pages 862–871, 2005. (Cité en page 9.)
- [Marians 1992] KJ. Marians. *Prokaryotic DNA replication*. Annu Rev Biochem, no. 61, pages 673–719, 1992. (Cité en page 5.)
- [Marko 2009] JF. Marko. *Linking topology of tethered polymer rings with applications to chromosome segregation and estimation of the knotting length*. Phys Rev E, no. 79, 2009. (Cité en page 39.)

- [Marvig & Blokesch 2010] RL. Marvig et M. Blokesch. *Natural transformation of Vibrio cholerae as a tool; optimizing the procedure*. BMC Microbiol, vol. 10, no. 155, 2010. (Cité en page 45.)
- [Mascarenhas et al. 2002] J. Mascarenhas, J. Soppa, AV. Strunnikov et PL. Graumann. *Cell cycle-dependent localization of two novel prokaryotic chromosome segregation and condensation proteins in Bacillus subtilis that interact with SMC protein*. EMBO J, no. 21, pages 3108–3118, 2002. (Cité en page 20.)
- [McInerney et al. 2007] P. McInerney, A. Johnson, F. Katz et M. O'Donnell. *Characterization of a triple DNA polymerase replisome*. Mol Cell, no. 27, pages 527–538, 2007. (Cité en page 6.)
- [Meibom et al. 2005] KL. Meibom, M. Blokesch, NA. Dolganov, CY. Wu et GK. Schoolnik. *Chitin induces natural competence in Vibrio cholerae*. Science, no. 310, pages 1824–1827, 2005. (Cité en page 45.)
- [Meile et al. 2011] JC. Meile, R. Mercier, M. Stouf, C. Pages, JY. Bouet et F. Cornet. *The terminal region of the E. coli chromosome localises at the periphery of the nucleoid*. BMC Microbiol, vol. 1, no. 11, 2011. (Cité en page 40.)
- [Melby et al. 1998] TE. Melby, CN Ciampaglio, G. Briscoe et HP. Erickson. *The symmetrical structure of structural maintenance of chromosomes (SMC) and MukB proteins : Long, antiparallel coiled coils, folded at a flexible hinge*. J Cell Biol, no. 142, pages 1595–1604, 1998. (Cité en page 20.)
- [Melderen & Bast 2009] L. Van Melderen et M. Saavedra De Bast. *Bacterial toxin-antitoxin systems : more than selfish entities ?* PLoS Genet, 2009. (Cité en page 44.)
- [Mercier et al. 2008] R. Mercier, M.A Petit, S. Schbath, S. Robin, M. El Karoui, F. Boccard et O. Espéli. *The MatP/matS Site-Specific System Organizes the Terminus Region of the E.coli Chromosome into a Macrodomain*. Cell, vol. 135, pages 475–485, 2008. (Cité en pages 23, 45, 48, 90 et 120.)
- [Mohl & Gober 1997] DA. Mohl et JW. Gober. *Cell cycle-dependent polar localization of chromosome partitioning proteins in Caulobacter crescentus*. Cell, no. 88, pages 675–684, 1997. (Cité en page 33.)
- [Morigen et al. 2009] Morigen, I. Odsbu et K. Skarstad. *Growth rate dependent numbers of SeqA structures organize the multiple replication forks in rapidly growing Escherichia coli*. Genes Cells, no. 14, pages 643–657, 2009. (Cité en page 3.)
- [Moulin et al. 2005] L. Moulin, AR. Rahmouni et F. Boccard. *Topological insulators inhibit diffusion of transcription-induced positive supercoils in the chromosome of Escherichia coli*. Mol. Microbiol, no. 55, pages 601–610, 2005. (Cité en page 17.)
- [Mouzopoulos et al. 2008] G. Mouzopoulos, M. Stamatakis, M. Tzurbakis, G. Batanis, E. Michou, R. Iannescu et M. Safioleas. *Lower extremity infections by Vibrio vulnificus*. Chirurgia, no. 103, pages 201–203, 2008. (Cité en page 46.)

- [Murphy & Zimmerman 1997] LD. Murphy et SB. Zimmerman. *Isolation and characterization of spermidine nucleoids from Escherichia coli*. J Struct Biol, vol. 3, no. 119, pages 321–335, 1997. (Cité en page 17.)
- [Muskhelishvili & Travers 2003] G. Muskhelishvili et A. Travers. *Transcription factor as a topological homeostat*. Front Biosci, no. 8, pages 279–285, 2003. (Cité en page 17.)
- [Nasmyth & Haering 2005] K. Nasmyth et C. Haering. *The structure and function of SMC and kleisin complexes*. Annu. Rev. Biochem., no. 74, pages 595–648, 2005. (Cité en pages 20 et 21.)
- [Nielsen & Lobner-Olesen 2008] O. Nielsen et A. Lobner-Olesen. *Once in a lifetime : strategies for preventing re-replication in prokaryotic and eukaryotic cells*. EMBO Rep, no. 9, pages 151–156, 2008. (Cité en page 43.)
- [Nielsen et al. 2006] HJ. Nielsen, JR. Ottesen, B. Youngren, SJ. Austin et FG. Hansen. *The Escherichia coli chromosome is organized with the left and right chromosome arms in separate cell halves*. Mol Microbiol, vol. 2, no. 62, pages 331–338, 2006. (Cité en pages 24, 32 et 38.)
- [Niki & Hiraga 1999] H. Niki et S. Hiraga. *Subcellular localization of plasmids containing the oriC region of the Escherichia coli chromosome, with or without the sopABC partitioning system*. Mol Microbiol, no. 34, pages 498–503, 1999. (Cité en page 43.)
- [Niki et al. 1991] H. Niki, A. Jaffe, R. Imamura, T. Ogura et S. Hiraga. *The new gene mukB codes for a 177 kDa protein with coiled-coil domains involved in chromosome partitioning*. EMBO J, no. 10, pages 183–193, 1991. (Cité en pages 20 et 39.)
- [Ohsumi et al. 2001] K. Ohsumi, M. Yamazoe et S. Hiraga. *Different localization of SeqA-bound nascent DNA clusters and MukF-MukE-MukB complex in Escherichia coli cells*. Mol Microbiol, no. 40, pages 835–845, 2001. (Cité en page 20.)
- [Okada et al. 2005] K. Okada, T. Iida, K. Kita-Tsukamoto et T. Honda. *Vibrios commonly possess two chromosomes*. J Bacteriol, no. 187, pages 752–757, 2005. (Cité en page 41.)
- [Painbeni et al. 1997] E. Painbeni, M. Carroff et J. Roubiere-Yaniv. *Alterations of the outer membrane composition in Escherichia coli lacking the histone-like protein HU*. Proc Natl Acad USA, no. 94, pages 6712–6717, 1997. (Cité en page 39.)
- [Pan et al. 1996] CQ. Pan, SE. Finkel, SE. Cramton, JA. Feng, DS. Sigma et RC. Johnson. *Variable structures of Fis-DNA complexes determined by flanking DNA-proteins contacts*. J Mol Biol, no. 264, pages 675–695, 1996. (Cité en page 17.)
- [Park et al. 2011] KT. Park, W. Wu, KP. Battaile, S. Lovell, T. Holyoak et J. Lutkenhaus. *The Min oscillator uses MinD-dependent conformational changes*

- in MinE to spatially regulate cytokinesis*. Cell, no. 146, pages 396–407, 2011. (Cité en page 36.)
- [Petrushenko *et al.* 2010] ZM. Petrushenko, Y. Cui, W. She et VV. Rybenkov. *Mechanics of DNA bridging by bacterial condensin MukBEF in vitro and in singulo*. EMBO J, no. 29, pages 1126–1135, 2010. (Cité en page 20.)
- [Postow *et al.* 2004] L. Postow, CD. Hardy, J. Arsuaga et NR. Cozzarelli. *Topological domain structure of the Escherichia coli chromosome*. Genes Dev., no. 18, pages 1766–1779, 2004. (Cité en page 14.)
- [Pratto *et al.* 2008] F. Pratto, A. Cicek, WA. Weihofen, R. Lurz, W. Saenger et JC. Alonso. *Streptococcus pyogenes pSM19035 requires dynamic assembly of ATP-bound ParA and ParB on parS DNA during plasmid segregation*. Nucleic Acids Res, no. 36, pages 3676–3689, 2008. (Cité en page 35.)
- [Ptacin *et al.* 2010] J. Ptacin, S. Lee, E. Garner, E. Toro, M. Eckart, L. Comolli, W. Moerner et L. Shapiro. *A spindle-loke apparatus guides bacterial chromosome segregation*. Nat Cell Biol, no. 12, pages 791–798, 2010. (Cité en pages 34 et 35.)
- [Quinn & Sueoka 1970] WG. Quinn et N. Sueoka. *Symmetric replication of the Bacillus subtilis chromosome*. Proc Natl Acad Sci USA, no. 67, pages 717–723, 1970. (Cité en page 3.)
- [Rahmoun & Wells 1992] AR. Rahmoun et RD Wells. *Direct evidence for the effect of transcription on local DNA supercoiling in vivo*. J Mol Biol, no. 223, pages 131–144, 1992. (Cité en page 17.)
- [Rao *et al.* 2009] NN. Rao, MR Gomez-Garcia et A. Kornberg. *Inorganic polyphosphate : essential for growth and survival*. Annu Rev Biochem, no. 78, pages 605–647, 2009. (Cité en page 124.)
- [Rashid *et al.* 2000] MH Rashid, K. Rumbaugh, L. Passador, DG. Davies, AN. Hamood, BH. Iglewski et A. Kornberg. *Polyphosphate kinase is essential for biofilm development, quorum sensing, and virulence of Pseudomonas aeruginosa*. PNAS, no. 97, pages 9636–9641, 2000. (Cité en page 124.)
- [Raskin & de Boer 1999] DM. Raskin et PA. de Boer. *Rapid pole-to-pole oscillation of a protein required for directing division to the middle of Escherichia coli*. Proc Natl Acad Sci USA, vol. 9, no. 96, pages 4971–4976, 1999. (Cité en page 9.)
- [Rasmussen *et al.* 2007] T. Rasmussen, RB. Jensen et O. Skovgaard. *The two chromosomes of Vibrio cholerae are initiated at different time-points un the cell cycle*. EMBO J, no. 26, pages 3124–3131, 2007. (Cité en pages 43, 94 et 121.)
- [Reyes-Lamothe *et al.* 2008] R. Reyes-Lamothe, C. Possoz, O. Danilova et DJ. Sherratt. *Independent positioning and action of Escherichia coli replisomes in live cells*. Cell, no. 133, pages 90–102, 2008. (Cité en page 39.)
- [Rice *et al.* 1996] PA. Rice, S. Yang, K. Mizuuchi et HA. Nash. *Crystal structure if an IHF-DNA complex : A protein-induced DNA U-turn*. Cell, no. 87, pages 1295–1306, 1996. (Cité en page 19.)

- [Rimsky *et al.* 2001] S. Rimsky, F. Zuber, M. Buckle et H. Buc. *A molecular mechanism for the repression of transcription by the H-NS protein*. Mol Microbiol, no. 42, pages 1311–1323, 2001. (Cité en page 19.)
- [Ringgaard *et al.* 2009] S. Ringgaard, ZJ. Van, M. Howard et K. Gerdes. *Movement and equipositioning of plasmids by ParA filament disassembly*. Proc Natl Acad Sci USA, no. 106, pages 19369–19374, 2009. (Cité en pages 34 et 35.)
- [Robinett *et al.* 1996] CC. Robinett, A. Straight, G. Li, C. Willhelm, G. Sudlow, A. Murray et AS. Belmont. *In vivo localization of DNA sequences and visualization of large-scale chromatin organization using lac operator-repressor recognition*. J Cell Biol, no. 135, pages 1685–1700, 1996. (Cité en page 24.)
- [Rocha *et al.* 2003] EPC. Rocha, J. Fralick, G. Vedyappan, A. Danchin et V. Norris. *A strand-specific model for chromosome segregation in bacteria*. Mol Microbiol, no. 49, pages 895–903, 2003. (Cité en page 9.)
- [Rocha 2002] EPC. Rocha. *Is there a role for replication fork asymmetry in the distribution of genes in bacterial genomes?* Trends Microbiol, no. 10, pages 393–396, 2002. (Cité en page 7.)
- [Rodley *et al.* 1995] PD. Rodley, U. Romling et B. Tummier. *A physical genome map of the Burkholderia cepacia type strain*. Mol Microbiol, no. 17, pages 57–67, 1995. (Cité en page 41.)
- [Romberg & Levin 2003] L. Romberg et PA. Levin. *Assembly dynamics of the bacterial cell division protein FtsZ : Poised at the edge of stability*. Annu Rev Microbiol, no. 57, pages 125–154, 2003. (Cité en page 9.)
- [Roth *et al.* 1996] JR. Roth, N. Benson, T. Galitski, K. Haack, JG. Lawrence et L. Miesel. *Rearrangements of the bacterial chromosome : formation and applications*. In Escherichia coli and Salmonella : Cellular and Molecular Biology, pages 2256–2276. F. Neihardt and others. Washington DC : American Society for Microbiology, 1996. (Cité en page 5.)
- [Rowlett & Margolin 2013] VW. Rowlett et W. Margolin. *The bacterial Min system*. Cell, vol. 23, pages 553–556, 2013. (Cité en page 11.)
- [Rudolph *et al.* 2013] CJ. Rudolph, AL. Upton, A. Stockum, CA. Nieduszynski et RG. Lloyd. *Avoiding chromosome pathology when replication forks collide*. Nature, vol. 500, pages 608–612, 2013. (Cité en page 7.)
- [Sagi *et al.* 2004] D. Sagi, N Friedman, C. Vorgias, AB Oppenheim et J Stavans. *Modulation of DNA conformations through the formation of alternative higher-order HU-DNA complexes*. J Mol Biol, no. 341, pages 419–428, 2004. (Cité en page 19.)
- [Salje *et al.* 2010] J. Salje, P. Gayathri et J. Löwe. *The ParMRC system : molecular mechanisms of plasmid segregation by actin-like filaments*. Nat Rev Microbiol, no. 8, pages 683–692, 2010. (Cité en page 34.)
- [Schneider *et al.* 1999] R. Schneider, A. Travers, T. Kutateladze et G. Muskhelishvili. *A DNA architectural protein couples cellular physiology and DNA*

- topology in Escherichia coli*. Mol Microbiol, no. 34, pages 953–964, 1999. (Cité en page 17.)
- [Schneider *et al.* 2001] R. Schneider, R. Lurz, G. Luder, C. Tolksdorf, A. Travers et G. Muskhelishvili. *An architectural role of the Escherichia coli chromatin protein FIS in organising DNA*. Nucleic Acids Res, no. 29, pages 5107–5114, 2001. (Cité en page 17.)
- [Schofield *et al.* 2010] W. Schofield, H. Lim et C. Jacobs-Wagner. *Cell cycle coordination and regulation of bacterial chromosome segregation dynamics by polarly localized proteins*. EMBO J, no. 29, pages 3068–3081, 2010. (Cité en page 38.)
- [Schroder & Wagner 2000] O. Schroder et R. Wagner. *The bacterial DNA-binding protein H-NS represses ribosomal RNA transcription by trapping RNA polymerase in the initiation complex*. J Mol Biol, no. 298, pages 737–748, 2000. (Cité en page 19.)
- [Schumacher 2008] MA. Schumacher. *Structural biology of plasmid partition : uncovering the molecular mechanisms of DNA segregation*. Biochem J, no. 412, pages 1–18, 2008. (Cité en page 33.)
- [Sengupta *et al.* 2010] M. Sengupta, H. Nielsen, B. Youngren et S. Austin. *P1 plasmid segregation : accurate redistribution by dynamic plasmid pairing and separation*. J Bacteriol, no. 192, pages 1175–1183, 2010. (Cité en page 34.)
- [Seong *et al.* 2002] GH. Seong, E. Kobatake, K. Miura, A. Nakazawa et M. Aizawa. *Direct atomic force microscopy visualization of integration host factor-induced DNA bending structure of the promoter regulatory region of the Pseudomonas TOL plasmid*. Biochem Biophys Res Commun, no. 291, pages 361–366, 2002. (Cité en page 19.)
- [Skoko *et al.* 2004] D. Skoko, B. Wong, RC. Johnson et JF Marko. *Micromechanical analysis of the binding of DNA-bending proteins HMGB1, NHP6A, and HU reveals their ability to form highly stable DNA-protein complexes*. Biochemistry, no. 43, pages 13867–13874, 2004. (Cité en page 19.)
- [Smith *et al.* 1981] GR. Smith, SM. Kunes, DW. Schultz, A. Taylor et KL. Triman. *Structure of Chi hotspots of generalized recombination*. Cell, no. 24, pages 429–436, 1981. (Cité en page 8.)
- [Spurio *et al.* 1992] R. Spurio, M. Durrenberger, M. Falconi, A. La Teana, CL. Pon et CO. Gualerzi. *Lethal overproduction of the Escherichia coli nucleoid protein H-NS : Ultramicroscopic and molecular autopsy*. Mol Gen Genet, no. 231, pages 201–211, 1992. (Cité en page 19.)
- [Srisvastava *et al.* 2006] P. Srisvastava, RA. Fekete et DK. Chattoraj. *Segregation of the replication terminus of the two Vibrio cholerae chromosomes*. J Bacteriol, no. 188, pages 1060–1070, 2006. (Cité en pages 43 et 44.)
- [Staczek & Higgins 1998] P. Staczek et NP. Higgins. *Gyrase and TopoIV modulate chromosome domain size in vivo*. Mol Microbiol, no. 29, pages 1435–1448, 1998. (Cité en pages 14 et 16.)

- [Stahl *et al.* 1975] FW. Stahl, JM. Crasemann et MM. Stahl. *Rec-mediated recombinational hot spot activity in bacteriophage lambda. III. Chi mutations are site mutations stimulating rec-mediated recombination.* J Mol Biol, no. 94, pages 203–212, 1975. (Cité en page 8.)
- [Steiner & Kuempel 1998] WW. Steiner et PL. Kuempel. *Sister chromatid exchange frequencies in Escherichia coli analyzed by recombination at the dif resolvase site.* J. Bacteriol, no. 180, pages 6269–6275, 1998. (Cité en page 40.)
- [Stokke *et al.* 2011] C. Stokke, T. Waldminghaus et K. Skarstad. *Replication patterns and organization of replication forks in Vibrio cholerae.* Microbiology, no. 157, pages 695–708, 2011. (Cité en page 3.)
- [Stouf *et al.* 2013] M. Stouf, JC. Meile et F. Cornet. *FtsK actively segregates sister chromosomes in Escherichia coli.* PNAS, vol. 110, no. 27, pages 11157–11162, 2013. (Cité en pages 8, 40 et 91.)
- [Sullivan *et al.* 2009] NL. Sullivan, KA. Marquis et DZ. Rudner. *Recruitment of SMC by ParB-parS organizes the origin region and promotes efficient chromosome segregation.* Cell, no. 137, pages 697–707, 2009. (Cité en page 39.)
- [Sureka *et al.* 2007] K. Sureka, S. Dey, P. Datta, AK. Singh, A. Dasgupta, S. Rodrigue, J. Basu et M. Kundu. *Polyphosphate kinase is involved in stress-induced mprAB-sigE-rel signalling in mycobacteria.* Mol Microbiol, no. 65, pages 261–276, 2007. (Cité en page 124.)
- [Suwanto & Kaplan 1989] A. Suwanto et S. Kaplan. *Physical and genetic mapping of the Rhodobacter sphaeroides 2.4.1 genome : presence of two unique circular chromosomes.* J Bacteriol, no. 171, pages 5850–5859, 1989. (Cité en page 41.)
- [Suzuki & Bird 2008] MM. Suzuki et A. Bird. *DNA methylation landscapes : provocative insights from epigenomics.* Nat Rev Genet, no. 9, pages 465–476, 2008. (Cité en page 42.)
- [Swinger *et al.* 2003] KK. Swinger, KM Lemberg, Y. Zhang et PA. Rice. *Flexible DNA bending in HU-DNA cocrystal structures.* EMBO J, no. 22, pages 3749–3760, 2003. (Cité en page 19.)
- [Swulius & Jensen 2012] MT. Swulius et GJ. Jensen. *The helical MreB cytoskeleton in E.coli MC1000/pLE7 is an artifact of the N-terminal YFP tag.* J Bacteriol, 2012. (Cité en page 35.)
- [Szeto *et al.* 2002] TH. Szeto, SL. Rowland, LI. Rothfield et GF. King. *Membrane localization of MinD is mediated by a C-terminal motif that is conserved accross eubacteria, archaea and chloroplasts.* Proc Natl Acad Sci USA, no. 99, pages 15693–15698, 2002. (Cité en page 10.)
- [Tanaka *et al.* 1976] N. Tanaka, M. Iseki, T. Miyoshi, H. Aoki et H. Imanaka. *Mechanism of action of bicyclomycin.* J Antibiot (Tokyo), no. 29, pages 155–168, 1976. (Cité en page 5.)
- [Tao *et al.* 1999] H. Tao, C. Bausch, C. Richmond, FR. Blattner et T. Conway. *Functional genomics : expression analysis of Escherichia coli growing on mi-*

- nimal and rich media*. J Bacteriol, no. 181, pages 6425–6440, 1999. (Cité en page 7.)
- [Teleman *et al.* 1998] AA. Teleman, PL. Graumann, DC. Lin, AD. Grossman et R. Losick. *Chromosome arrangement within a bacterium*. Curr Biol, no. 8, pages 1102–1109, 1998. (Cité en pages 28, 40, 44 et 94.)
- [Thanbichler *et al.* 2005] M. Thanbichler, SC. Wang et L. Shapiro. *The bacterial nucleoid : a highly organized and dynamic structure*. J Cell Biochem, no. 96, pages 506–521, 2005. (Cité en page 18.)
- [Tonthat *et al.* 2011] NK. Tonthat, ST. Arold, BF. Pickering, MW. Van Dyke, S. Liang, Y. Lu, TK. Beuria, W. Margolin et MA. Schumacher. *Molecular mechanism by which the nucleoid occlusion factor SlmA, keeps cytokinesis in check*. EMBO J, vol. 1, no. 30, pages 154–164, 2011. (Cité en page 10.)
- [Trucksis *et al.* 1998] M. Trucksis, J. Michalski, YK. Deng et JB. Kaper. *The Vibrio cholerae genome contains two unique circular chromosomes*. PNAS, no. 95, pages 14464–14469, 1998. (Cité en page 41.)
- [Umbarger *et al.* 2011] MA. Umbarger, E. Toro, MA. Wright, GJ Porreca, D. Bau, SH. Hong, MJ. Fero, LJ. Zhu, MA. Marti-Renom, HH. McAdams, L. Shapiro, J. Dekker et GM. Church. *The three-dimensional architecture of a bacterial genome and its alteration by genetic perturbation*. Mol Cell, vol. 2, no. 44, pages 252–264, 2011. (Cité en pages 26, 29, 39 et 90.)
- [Valens *et al.* 2004] M. Valens, S. Penaud, M. Rossignol, F. Cornet et F. Boccard. *Macrodomain organization of the Escherichia coli chromosome*. EMBO J, no. 23, pages 4330–4341, 2004. (Cité en pages 21, 22 et 31.)
- [Vallet-Gely & Boccard 2013] I. Vallet-Gely et F. Boccard. *Chromosomal organization and segregation in Pseudomonas aeruginosa*. PLoS Genet, no. 9, 2013. (Cité en pages 31, 32, 40, 44 et 94.)
- [Varshavsky *et al.* 1977] AJ. Varshavsky, SA. Nedospasov, VV. Bakayev, TG. Bakayeva et GP. Georgiev. *Histone-like proteins in the purified Escherichia coli desoxyribonucleoprotein*. Nucleic Acids Res, vol. 8, no. 4, pages 2725–2745, 1977. (Cité en page 17.)
- [Vecchiarelli *et al.* 2010] AG. Vecchiarelli, YW. Han, X. Tan, M. Mizuuchi, R. Ghirlando, C. Biertümpfel, BE. Funnell et K. Mizuuchi. *ATP control of dynamic P1 ParA-DNA interactions : a key role for the nucleoid in plasmid partition*. Mol Microbiol, no. 78, pages 78–91, 2010. (Cité en pages 34, 35 et 36.)
- [Vecchiarelli *et al.* 2012] AG. Vecchiarelli, K. Mizuuchi et BE. Funnell. *Surfing biological surfaces : exploiting the nucleoid for partition and transport in bacteria*. Mol Microbiol, no. 86, pages 513–523, 2012. (Cité en page 37.)
- [Venkova-Canova & Chattoraj 2011] T. Venkova-Canova et DK. Chattoraj. *Transition from a plasmid to a chromosomal mode of replication entails additional regulators*. Proc Natl Acad Sci USA, no. 108, pages 6199–6204, 2011. (Cité en pages 42 et 94.)

- [Venkova-Canova *et al.* 2013] T. Venkova-Canova, JH. Baek, PC. Fitzgerald, M. Blokesch et DK. Chattoraj. *Evidence for two different regulatory mechanisms linking replication and segregation of Vibrio cholerae chromosome II*. PLoS Genet, no. 9, 2013. (Cité en page 44.)
- [Ventura *et al.* 2013] B. Di Ventura, B. Knecht, H. Andreas, WJ. Godinez, M. Fritsche, K. Rohr, W. Nickel, DW. Heerman et V. Sourjik. *Chromosome segregation by the Escherichia coli Min system*. Mol Syst Biol, no. 9, 2013. (Cité en pages 10 et 12.)
- [Viollier *et al.* 2004] PH. Viollier, M. Thanblicher, PT. McGrath, L. West, M. Meehan, HH. MacAdams et L. Shapiro. *Rapid and sequential movement of individual chromosomal loci to specific subcellular locations during bacterial DNA replication*. Proc Natl Acad Sci USA, no. 101, pages 9257–9262, 2004. (Cité en pages 29, 33, 40, 43, 44 et 94.)
- [Visick *et al.* 2000] KL. Visick, J. Foster, J. Doino, M. McFall-Ngai et EG. Ruby. *Vibrio fischeri lux genes play an important role in colonization and development of the host light organ*. J Bacteriol, no. 182, pages 4578–4586, 2000. (Cité en page 46.)
- [Visvalingam *et al.* 2012] J. Visvalingam, CO. Gill et RA. Holley. *The viabilities of cells in cultures of Escherichia coli growing with formation of filaments at 6 °C*. Int J Food Microbiol, no. 153, pages 129–134, 2012. (Cité en page 5.)
- [Waldminghaus & Skarstad 2009] T. Waldminghaus et K. Skarstad. *The Escherichia coli SeqA protein*. Plasmid, no. 61, pages 141–150, 2009. (Cité en page 42.)
- [Wang *et al.* 2006] X. Wang, X. Liu, C. Possoz et DJ. Sherratt. *The two Escherichia coli chromosome arms locate to separate cell halves*. Genes Dev, no. 20, pages 1727–1731, 2006. (Cité en page 32.)
- [Wang *et al.* 2008] X. Wang, R. Reyes-Lamothe et D.J. Sherratt. *Visualizing genetic loci and molecular machines in living bacteria*. Biochem Soc Trans, no. 36, pages 749–753, 2008. (Cité en page 24.)
- [Wang *et al.* 2011] W. Wang, G-W. Li, C. Chen, X.S. Xie et X. Zhuang. *Chromosome organization by a nucleoid-associated protein in live bacteria*. Science, vol. 333, no. 6048, pages 1445–1449, 2011. (Cité en page 19.)
- [Wang *et al.* 2013] X. Wang, P. Montero Llopis et DZ. Rudner. *Organization and segregation of bacterial chromosomes*. Nat Rev Genet, no. 14, pages 191–203, 2013. (Cité en pages 16, 25, 27, 29 et 30.)
- [Webb *et al.* 1997] CD. Webb, A. Teleman, S. Gordon, A. Straight, A. Belmont, DC. Lin, AD. Grossman, A. Wright et R. Losick. *Bipolar localization of the replication origin regions of chromosomes in vegetative and sporulating cells of B. subtilis*. Cell, no. 88, pages 667–674, 1997. (Cité en page 28.)
- [Webb *et al.* 1998] CD. Webb, PL. Graumann, JA. Kahana, AA. Teleman, PA. Silver et R. Losick. *Use of time-lapse microscopy to visualize rapid movement*

- of the replication origin region of the chromosome during the cell cycle in Bacillus subtilis*. Mol Microbiol, no. 28, pages 883–892, 1998. (Cité en pages 33 et 38.)
- [White *et al.* 2008] MA. White, JK. Eykelenboom, MA. Lopez-Vernaza, E. Wilson et DRF. Leach. *Non-random segregation of sister chromosomes in Escherichia coli*. Nature, vol. 455, pages 1248–1250, 2008. (Cité en page 39.)
- [Worcel & Burgi 1972] A. Worcel et E. Burgi. *On the structure of the folded chromosome of Escherichia coli*. J Mol Biol, vol. 71, no. 2, pages 127–147, 1972. (Cité en page 14.)
- [Wu & Errington 1998] LJ. Wu et J. Errington. *Use of asymmetric cell division and spoIIIE mutants to probe chromosome orientation and organization in Bacillus subtilis*. Mol Microbiol, no. 27, pages 777–786, 1998. (Cité en page 28.)
- [Wu & Errington 2004] LJ. Wu et J. Errington. *Coordination of cell division and chromosome segregation by a nucleoid occlusion protein in Bacillus subtilis*. Cell, vol. 7, no. 117, pages 915–925, 2004. (Cité en pages 10 et 13.)
- [Wu *et al.* 1988] HY. Wu, SH. Shyy, JC. Wang et LF. Liu. *Transcription generates positively and negatively supercoiled domains in the template*. Cell, no. 53, pages 433–440, 1988. (Cité en page 17.)
- [Wu *et al.* 2009] LJ. Wu, S. Ishikawa, Y. Kawai, T. Oshima, N. Ogasawara et J. Errington. *Noc protein binds to specific DNA sequences to coordinate cell division with chromosome segregation*. EMBO J, no. 28, pages 1940–1952, 2009. (Cité en page 13.)
- [Yamaichi *et al.* 1999] Y. Yamaichi, T. Iida, KS. Park, K. Yamamoto et T. Honda. *Physical and genetic map of the genome of Vibrio parahaemolyticus : presence of two chromosomes in Vibrio species*. Mol Microbiol, no. 31, pages 1513–1521, 1999. (Cité en page 41.)
- [Yamaichi *et al.* 2007] Y. Yamaichi, MA. Fogel et MK. Waldor. *par genes and the pathology of chromosome loss in Vibrio cholerae*. PNAS, vol. 104, no. 2, pages 630–635, 2007. (Cité en pages 44 et 48.)
- [Yazdi *et al.* 2012] N. Hadizadeh Yazdi, CC. Guet, RC. Johnson et JF. Marko. *Variation of the folding and dynamics of the Escherichia coli chromosome with growth conditions*. Mol Microbiol, no. 86, pages 1318–1333, 2012. (Cité en page 30.)
- [Yuan *et al.* 2011] J. Yuan, Y. Yamaichi et MK. Waldor. *The three Vibrio cholerae Chromosome II-encoded ParE Toxins Degrade Chromosome I following loss of Chromosome II*. J Bacteriol, vol. 3, no. 193, pages 611–619, 2011. (Cité en page 44.)
- [Yuzhakov *et al.* 1996] A. Yuzhakov, J. Turner et M. O'Donnell. *Replisome assembly reveals the basis for asymmetric function in leading and lagging strand replication*. Cell, no. 86, pages 877–886, 1996. (Cité en page 6.)

- [Zeigler & Dean 1990] DR. Zeigler et DH. Dean. *Orientation of genes in the Bacillus subtilis chromosome*. Genetics, no. 125, pages 703–708, 1990. (Cité en page 7.)

Résumé : L'objectif de cette thèse est de définir la chorégraphie de ségrégation des deux chromosomes circulaires de *Vibrio cholerae*, c'est à dire le positionnement de l'information génétique au cours de la croissance de la cellule, ainsi que les mécanismes dirigeant ces ségrégations. Il a longtemps été supposé que les bactéries étaient trop petites pour avoir une organisation intra-cellulaire, et le manque de techniques appropriées ne permettait pas d'infirmer cette hypothèse. Or la taille des chromosomes comparée à celle de la bactérie impose une compaction et aujourd'hui, de nouvelles techniques de microscopie et d'analyse génétique permettent d'affirmer que les chromosomes bactériens étudiés jusqu'à maintenant ont tous une organisation et une chorégraphie de ségrégation précises et différentes selon les espèces.

Toutes les espèces étudiées à ce jour ont un chromosome circulaire unique : la réplication du chromosome commence à une origine unique bidirectionnelle, les deux fourches de réplication se déplacent le long des deux bras de réplication (ou réplichores) et finissent la réplication au terminus, diamétralement à l'opposée de l'origine de réplication sur la carte du chromosome.

Peu d'espèces ont été étudiées, et *Vibrio cholerae* émerge progressivement comme un nouveau modèle : son génome est réparti sur deux chromosomes, et la chorégraphie de plusieurs chromosomes dans une cellule n'a jamais été décrite. De plus, cette espèce semble être au croisement évolutif entre *Caulobacter crescentus* et *Escherichia coli* : *Vibrio cholerae* a d'une part une morphologie en croissant, des systèmes de partition aux origines et un positionnement de l'origine du chromosome I, semblables à *C. crescentus*, et d'autre part un système de compaction du terminus et un set de gènes impliqués dans la maintenance du chromosome ayant co-évolué, qu'on ne retrouve que dans peu d'espèces proches d'*E. coli*. Une autre caractéristique intéressante de *V. cholerae* est que le chromosome II semble avoir été acquis récemment et n'est donc peut être pas gouverné par les mêmes mécanismes que le chromosome I, comme en témoignent le positionnement de son origine et son terminus, inédits pour des chromosomes bactériens.

Parmi les Vibrios (environ 60 espèces principalement retrouvées dans les environnements aquatiques), certaines espèces sont des pathogènes dévastateurs pour les poissons, le corail, les crustacés ou les fruits de mer. Mais la plus documentée est *Vibrio cholerae*, car elle provoque chez l'Humain une maladie provoquée par l'ingestion d'eau contaminée qui peut être mortelle si le patient n'est pas réhydraté à temps. Bien que facilement traitable, le choléra fait encore de nombreuses victimes dans les pays en développement où les structures de santé et les règles d'hygiène font parfois défaut. Ainsi l'étude de *Vibrio cholerae* présente un intérêt médical, mais également par extension aux autres Vibrios, un intérêt environnemental non négligeable.

Mots clés : *Vibrio cholerae*, chromosome bactérien, système de partition, microscopie de fluorescence