HAL
open science

Organisation du chromosome bactérien d'Escherichia coli : analyse fonctionnelle de la condensine MukBEF

Mohammed Seba

To cite this version:

Mohammed Seba. Organisation du chromosome bactérien d'Escherichia coli : analyse fonctionnelle de la condensine MukBEF. Bactériologie. Université Paris-Saclay, 2023. Français. NNT : 2023UPASL039 . tel-04098854

HAL Id: tel-04098854

https://theses.hal.science/tel-04098854v1

Submitted on 16 May 2023

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

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

université PARIS-SACLAY

Organisation du chromosome bactérien d'*Escherichia coli* : analyse fonctionnelle de la condensine MukBEF

Bacterial chromosome organization by condensins: functional analysis of MukBEF in E. coli

Thèse de doctorat de l'université Paris-Saclay

École doctorale n°577, Structure et dynamique des systèmes vivants (SDSV)
Spécialité de doctorat : Sciences de la vie et santé.
Référent : Faculté des sciences d'Orsay

Thèse préparée dans l'unité de recherche **Institute for Integrative Biology of the Cell (I2BC) (Université Paris-Saclay, CEA, CNRS)**, sous la direction de **Frédéric BOCCARD**, directeur de recherche, le co-encadrement de **Stéphane DUIGOU**, chargé de recherche.

Thèse soutenue à Paris-Saclay, le 26 avril 2023, par

Mohammed SEBA

Composition du Jury

Membres du jury avec voix délibérative

Olga SOUTOURINA Professeure, Université Paris-Saclay	Présidente
Nathalie CAMPO Directrice de recherche, CNRS, Université de Toulouse	Rapporteur & Examinatrice
François CORNET Directeur de recherche, CNRS, Université de Toulouse	Rapporteur & Examinateur
Ivan JUNIER Directeur de recherche, CNRS, Université de Grenoble	Examinateur

THESE DE DOCTORAT

NNT : 2023UPASL039

ÉCOLE DOCTORALE
Structure et dynamique des systèmes vivants (SDSV)

université PARIS-SACLAY

Titre : Organisation du chromosome bactérien d'*Escherichia coli* : analyse fonctionnelle de la condensine MukBEF.

Mots clés : Bactéries, conformation du chromosome, capture de conformation chromosomique 3C-seq/HiC, condensine, MukBEF, MatP/*matS*.

Résumé : La condensation des chromosomes et leur ségrégation sont deux processus essentiels à la transmission du matériel génétique chez tous les êtres vivants. En effet, les chromosomes sont constitués d'une molécule d'ADN et de plusieurs familles de protéines qui assurent plusieurs fonctions liées à l'ADN. Les complexes SMC ubiquitaires dans le monde vivant font partie de ces protéines qui façonnent le chromosome, et leur étude est d'une grande importance dans la compréhension des mécanismes de condensation, de ségrégation et des liens possibles entre eux.

Le complexe SMC MukBEF est la condensine de la bactérie *Escherichia coli*. Bien que MukBEF soit essentiel dans des conditions de croissance rapide, sa délétion est tolérée en croissance lente, et se caractérise par la production de cellules anucléées reflétant un défaut de ségrégation des chromosomes. La technique de capture de conformation du chromosome (3C-seq/HiC) a révélé que MukBEF favorise des contacts de longue distance sur tout le chromosome, sauf dans le domaine Ter où elle est inhibée par le système MatP/*matS*.

Durant ma thèse, je me suis intéressé à la caractérisation de l'activité de MukBEF sur le chromosome. J'ai pu mettre en évidence que le chargement de MukBEF, contrairement aux autres condensines bactériennes étudiées, se fait de manière non spécifique de site. De plus, j'ai identifié que ce chargement est plus efficace sur de l'ADN néo-répliqué. Je me suis également intéressé à la caractérisation du mécanisme d'inhibition de MukBEF par le système MatP/*matS* dans le domaine Ter. MatP est une protéine qui se fixe spécifiquement à 28 sites *matS* répartis dans le domaine Ter. Mes résultats permettent de proposer un mécanisme d'inhibition qui consiste en un déchargement de MukBEF du chromosome à proximité des bordures du Ter. J'ai également pu montrer que 3 sites *matS* suffisent pour inhiber MukBEF, mais que l'ajout de sites supplémentaires renforce l'efficacité de cette inhibition. De plus, l'analyse de la répartition des sites *matS* dans plusieurs chromosomes bactériens suggère que l'augmentation du nombre de sites *matS* et de leur densité à proximité du site *dif* vise à empêcher le chargement de MukBEF à proximité du site *dif*.

Title : Bacterial chromosome organization by condensins: functional analysis of MukBEF in *E.coli*

Keywords : Bacteria, Chromosome conformation, chromosome conformation capture 3C-seq/HiC, condensine, MukBEF, MatP/*matS*.

Abstract : Chromosome condensation and segregation are two essential processes for the transmission of genetic material in all living organisms. Indeed, chromosomes are composed of a DNA molecule and several families of proteins that perform various functions related to DNA. Ubiquitous SMC complexes in the living world are among these proteins that constitute the chromosome, and their study is of great importance in understanding the mechanisms of condensation, segregation, and their possible links.

The MukBEF SMC complex is the condensin of the bacterium *Escherichia coli*. Although MukBEF is essential under fast growth conditions, its deletion is tolerated under slow growth, and is characterized by the production of anucleate cells reflecting a defect in chromosome segregation. The chromosome conformation capture technique (3C-seq/HiC) has revealed that MukBEF promotes long-distance contacts throughout the chromosome, except in the Ter domain where it is inhibited by the MatP/*matS* system.

During my thesis, I focused on characterizing the activity of MukBEF on the chromosome. I was able to demonstrate that the loading of MukBEF, unlike other bacterial condensins that have been studied, occurs without site specificity.Additionally, I identified that this loading is more efficient on newly replicated DNA. I also investigated the characterization of the inhibition mechanism of MukBEF by the MatP/*matS* system in the Ter domain. MatP is a protein that specifically binds to 28 *matS* sites distributed in the Ter domain. My results suggest a mechanism of inhibition that involves unloading MukBEF from the chromosome near the borders of the Ter domain. Furthermore, I demonstrated that 3 *matS* sites are sufficient to inhibit MukBEF, but the addition of additional sites strengthens the effectiveness of this inhibition. Moreover, the analysis of the distribution of matS sites in several bacteria suggests that increasing the number of *matS* sites and their density near the dif site aims to prevent MukBEF loading near the *dif* site.

REMERCIEMENTS

"La gratitude est la mémoire du cœur." Lao Tseu

Tous mes remerciements et gratitudes, à/aux

... membres du jury : Olga SOUTOURINA, Nathalie CAMPO, François CORNET et Ivan JUNIER qui ont accepté et pris le temps de lire et d'évaluer mon travail. Je vous remercie également pour votre présence et toutes les discussions intéressantes durant ma soutenance, ainsi que tous les échanges qui ont suivi. De ma part, je garde un souvenir de vocation partagée, et j'espère que ces moments trouveront également pour vous une mémoire positive !

... membres de mes comités de thèse : Stéphane MARCAND, mon tuteur durant ma thèse, et Marie-Eve VAL-KENNEDY. Vos remarques, vos conseils et vos observations étaient très précieux dans la conduite et l'orientation de mon projet de thèse. Votre point de vue extérieur pertinent nous a permis de nous questionner sur la pertinence des questions posées, sur les méthodes d'analyse employées et également sur l'interprétation des résultats obtenus. Pour moi, chaque comité de thèse passée avec vous était un bon moment de partage et d'apprentissage de grande qualité scientifique, et de profonde qualité humaine.

... Frédéric BOCCARD en tant que chef d'équipe, qui m'a accueillie dans son laboratoire, et m'a fait confiance et encouragée durant ma thèse. Je retiendrai les appels durant le premier confinement comme un bon souvenir !

... Fred en tant qu'encadrant, pour tous ses conseils, remarques et surtout sa patience contagieuse pour la science en général, et ses propres sujets de recherche en particulier. J'ai appris grâce à vous que pour saisir un concept, il faut essayer de le voir sous tous les angles possibles. J'ai appris cela durant les derniers moments de préparation de la soutenance : « Momo, dans la vie, il faut toujours avoir un plan ».

... Stéphane DUIGOU, mon encadrant, pour la science qui m'a fait découvrir, pour l'état d'esprit du bon chercheur qui m'a été montré chaque jour et pour son esprit humain et honnête qui a rendu le travail avec lui un chemin de progression scientifique et Humaine. Stéphane, merci pour ta confiance, ta patience et ton humour. J'ai retenu que tu m'as dit durant l'entretien du master II que nous allons faire de bonnes choses ! Je me souviens que tu m'as dit que la thèse est un marathon et non pas un sprint. Tu m'as appris, par le silence et parfois l'humour, qu'on

peut être contrarié, en colère où triste, ... mais que cela ne nous donne pas le droit de manquer de respect aux autres. Pour moi, tu es le meilleur encadrant que j'ai connu et je pense que tu as mis la barre un peu haute pouvoir t'approcher. Néanmoins, ton chemin de constance est clair et droit pur ceux qui veulent marcher dans tes traces. Je te souhaite un prix Nobel dans la poche, de la lumière dans l'esprit et de la paix dans le cœur pour la suite de ta vie. Pour ma part, j'ai encore du chemin à faire pour apprendre à organiser mes idées.

... Les membres de mon équipe qui m'ont aidé, soutenu, conseillé, enseigné. Je n'oublierai pas votre soutien depuis mon stage de master II : Isabelle Vallet, Virginia S. Lioy et tous les membres qui nous ont rejoints ensuite : Laura LEBRUN, Sokrich PONNDARA, Mounia KORTEBI, Stéphanie BURY-MONE, Hoda JAFFAL et Nicolas DELHAYE. Je vous remercie également pour tous les moments de partage et de vie commune, les pauses café, les « Tea time » et les pique-niques. Je tiens également à remercier tous les étudiants et les collaborateurs qui sont passés au laboratoire et de qui j'ai appris une nouvelle vision des choses avec leurs modèles particuliers et leurs questions très diversifiées. Un grand remerciement à Ian MEDICI qui a immortalisé mon jour de soutenance par les photos qu'il a prises et à Sokrich pour son grand apport artistique au laboratoire.

Je remercie les équipes voisines, l'équipe Barre, l'équipe Yamaichi, l'équipe Santos et l'équipe Noordermeer pour toutes leurs aides, discussions et tous les déjeuners partagés. Un remerciement spécial à Sourav GHOSH et Laura MONIOT PERRON pour leur amitié sincère. Je tiens également à remercier Jihane CHALLITA pour sa gentillesse et toutes les discussions que nous avons eues au labo ou sur le chemin du laboratoire.

Je remercie le responsable de mon Master II, Jean-Luc FERAT, et son ancien thésard, Yazid ADAM, pour leurs conseils inestimables et leur présence.

Je remercie les soutiens de l'ombre, les responsables de la cuisine, Cindy et Pascaline, qui ont toujours été d'une très grande aide pour le bon déroulement du laboratoire, et surtout pour leurs sourires !

Je remercie l'équipe de Nicolas MIROUZE, qui m'a très bien accueilli, et avec qui j'ai appris le travail sur les levures. Je tiens à remercier Nicolas MIROUZE pour tous ses conseils et le temps qu'il nous a accordé pour les discussions, sans oublier Yuan pour son aide, ses explications très pratiques et le temps qu'il m'a accordé.

... l'association YOUR-I2BC et tous ceux qui m'ont aidé de près ou de loin durant ma thèse !

... tous mes enseignants de Master I de l'université de Lorraine, Nancy : Bruno CHARPENTIER, Stéphane LABIALLE et Mathieu REDERSTORFF, avec qui j'ai appris beaucoup de choses en un temps record (par rapport à mes capacités). Vous m'avez donné l'envie de continuer vers l'avant, vous m'avez écouté et très bien conseillé.

... Annaëlle MEHR, qui m'a apporté une aide précieuse lors de la rédaction de ma thèse, et qui a était de très bon conseil.

... tous mes enseignants en Algérie et tous mes amis qui m'ont aidé à entamer ce voyage, notamment mon cousin Toufik SEBA, Fawzi IDER, El Hadj TIRICHINE et Yacine HAMMOUDA.
Je dois un remerciement spécial à mon frère et binôme de Master II en Algérie, Tahri DJILLALI, avec qui j'ai partagé des moments d'apprentissage en biologie et un intérêt pour l'Histoire. C'est pour moi un exemple de l'Homme qui s'épanouit en donnant le maximum pour sa vocation.

… pour ma famille qui m’a soutenu, mes parents qui sont restés proches de moi dans les moments les plus incertains avant mon aventure en France, et pendant également !
… mon frère pour son soutien, ses services et ses questions pertinentes qui m’ont poussé à m’interroger et à retrouver dans mon expérience personnelle ce que je peux partager et transmettre.

… mes amis pour leurs appels et leurs encouragements : Noureddine HADJ MOUSSA, Bachir FERTAS, Youcef BESSAKHOUAD, Hammou BOUHARI, Réda SALMI, Omar KARIM...

… tous les membres de l’école NA : Cathy PEYTHIEU, Margaux NOVELLI, Jean-René GALAVERNA NAJERA… qui m’ont aidé à trouver une posture plus stable pour continuer à faire de la science. Grâce à vous, j’ai pu voir et avancer !

Tous les gens qui m’ont aidé à regarder plus loin et plus clairement. Je suis reconnaissant et grâce à vous, je me sens toujours accompagné par vos lumières !

Table de matières

Liste des figures **7**

Liste des tableaux **8**

Liste des abréviations **9**

Introduction générale **10**

A. Les complexes SMC dans le monde vivant **12**

I. Les SMC eucaryotes **13**
1. Les condensines eucaryotes 13
a. Structure et composition du complexe 13
b. Rôle des condensine I et II 16
c. Régulation des condensines eucaryotes 16
d. Extrusion des boucles d'ADN par la condensine 17
2. Les cohésines eucaryotes 20
a. La cohésine mitotique 20
b. La cohésine méiotique 23
c. Fonction et mode d'action des cohésines 24
d. Extrusion de boucles d'ADN par la cohésine 27
e. Formation de domaines et TADs 27

II. Les SMC bactériens **29**
1. Smc-ScpAB 30
2. MksBEF 30
3. MukBEF 31

B. Le chromosome bactérien **31**

I. Structuration du chromosome bactérien **34**
1. Structuration multi-échelle du chromosome bactérien 34
2. Le système MatP/matS et le macrodomaine Ter 35

II. La ségrégation des chromosomes chez les bactéries **40**
1. Le système ParABS 40
2. La ségrégation par les condensines bactériennes 42
a. Smc-ScpAB 42
b. MksBEF 42
c. MukBEF 43

III. Le rôle des condensines bactériennes dans la conformation du chromosome **46**
1. SMC-ScpAB 46
a. Chargement de Smc-ScpAB 46
b. Activité et translocation de Smc-ScpAB 47
c. Le déchargement de Smc-ScpAB 51
2. MksBEF 56
3. MukBEF 59
a. Activité biochimique et interactions protéiques de MukBEF 59
b. AcpP 64
c. Topo IV 64
d. MatP 64

e. Conformation du chromosome par MukBEF 66
C. Projet de thèse 72
I. Caractérisation fonctionnelle de l'activité de la condensine bactérienne MukBEF . 72
II. Caractérisation de l'inhibition de MukBEF par le système MatP/matS 73
Résultats 76
Article: " Activity of MukBEF for chromosome management in *E. coli* and its inhibition by MatP" 76
Résumé de l'article 76
Résultats supplémentaires 79
La complémentation par l'expression de *mukF* 79
La conformation du chromosome après induction de *mukF* 80
La formation des contacts par MukBEF après redémarrage de réplication 84
Interaction physique directe entre MatP et MukBEF 84
Génération des mutants ciblés d'interaction MatP-MukB 87
Trans-complémentation de *mukBEF* par *mksBEF* de *P. aeruginosa*. 90
Discussion 93
Le chargement de MukBEF sur le chromosome : un chargement sans sites spécifiques 93
L'activité de MukBEF 95
Interconnexion entre la réplication et la conformation du chromosome 98
Déchargement de MukBEF du chromosome 100
Références bibliographiques 104

Liste des figures

Figure 1 : Les complexes SMC eucaryotes..... 14

Figure2 : Complexes SMC : similitudes et différences architecturales..... 15

Figure 3 : Schéma de la réorganisation chromosomique durant une partie du cycle cellulaire. 18

Figure 4 : Chargement de la condensine II sur le chromosome..... 19

Figure 5 : Structure de la condensine *de S. cerevisiae* et ces modes d'actions sur l'ADN. 21

Figure 6 : La cohésine durant la mitose et la méiose. 22

Figure 7 : Schéma représentatif de la régulation de la composition de la cohésine durant le cycle cellulaire..... 25

Figure 8 : Schéma représentatif de la diversité des fonctions assurées par la cohésine durant le cycle cellulaire. 26

Figure 9 : Disposition et organisation du chromosome bactérien. 33

Figure 10 : MatP ancre le macrodomaine Ter au septum de division. 38

Figure 11 : La ségrégation du chromosome chez *Pseudomonas aeruginosa.* 44

Figure 12 : Ségrégation du chromosome d'*E.coli* par MukBEF..... 45

Figure 14 : Les facteurs qui affectent l'activité de Smc-ScpAB chez *B. subtilis*..... 49

Figure 15 : Collision des complexes Smc-ScpAB chez *B. subtilis*..... 52

Figure 16 : Déchargement de Smc-ScpAB par XerD chez *B. subtilis*..... 53

Figure 17 : Efficacité du déchargement de Smc-ScpAB par XerD/*XDS* chez B. subtilis. 55

Figure 18 : Conformation du chromosome de *Pseudomonas aeruginosa* dans différents contextes génétiques. 57

Figure 19 : L'activité de conformation du chromosome par MksBEF en présence de Smc-ScpAB. 58

Figure 20 : Représentation schématique du complexe MukBEF basé sur des résultats de cristallographie. 62

Figure 21 : Structure Cryo-EM de MukBEF en association avec l'ADN et MatP. 63

Figure 22 : Changement de conformation du complexe MukBEF lors de l'interaction avec MatP/*matS* 65

Figure 23 : Rôle de MukB et MatP dans la conformation du chromosome d'*Ecoli* 67

Figure 24 : Impact de l'expréssion de *mukBEF* sur la conformation des chromosomes de *P. aeruginosa* et d'*E.coli*: 68

Figure 25 : Observation de MukB-GFP chez *E.coli* formation d'un "corps axial" 71

Figure 26 : Cinétique d'induction de mukF avec le plasmide pZE21 inductible à l'ATC. 81

Figure 27 : Effet de la réplication et de MukBEF sur la conformation du chromosome. 82

Figure 28 : Complémentation du mutant mukF par le plasmide *pPSV38-mukF* inductible à l'IPTG..... 83

Figure 29 : Interaction physique MukBEF-MatP par double hybride chez *S. cerevisiae* 86

Figure 30 : Complémentation de la ségrégation et de la conformation du chromosome. 88

Figure 31 : Génération de mutants MatP ciblant l'interaction avec MukB. 89

Figure 32 : La formation des contacts cis par MukBEF en cours de réplication..... 91

Figure 33 : Schéma représentatif des contacts formés par MukBEF après induction 97

Figure 34 : Schéma représentatif du chargement de MukBEF sur le chromosome, en présence de la réplication. 99

Figure 35 : Schéma représentatif de la distribution de MukBEF dans le Ter lors de sa réplication 103

Liste des tableaux

Tableau 1 : Phénotypes des délétions des smc bactérien. 39

Liste des abréviations

3C : Capture de Conformation Chromosomique

3D-SIM : Structured illumination microscopy /éclairage structuré à trois dimensions

ADN : Acide DésoxyriboNucléique

ATC : Anhydrotétracycline

ATP: Adénosine TriPhosphate

ChIP : Chromatin immunoprecipitation

CID : Chromosomal Interaction Domain –Domaine d'interactions chromosomiques

Co- IP: Co-Immunoprecipitation

Cryo-EM : Cryomicroscopie électronique

CTCF : CCCTC-binding factor

C-Terminale : Extrémité carboxy-terminale

DAPI: 4',6-diamidino-2-phénylindole

FISH : Fluorescence in situ hybridization

FRAP : Fluorescence recovery after photobleaching

GFP : Green Fluorescent Protein

HiC : High-throughput sequencing

IPTG: Isopropyl β- d-1-thiogalactopyranoside

Kb : Kilobase

Mb : Mégabase

MD : Macrodomaine

MM : Milieu Minimum

NAP : Nucleoid Associated Protein – Protéine associée à l'ADN

N-Terminale : Extrémité amino-terminale

PALM : Photo-activated localization microscopy

Pb : Paire de base

SMC : Structural Maintenance of Chromosome

STED : stimulated-emission-depletion microscopy

TAD : Topological Associated Domain –Domaine associé à la topologie

TSS : transcription start site

XDS : XerD binding site

Introduction générale

Depuis les travaux de Charles Darwin, il est communément admis que la nature sélectionne les êtres vivants dotés de caractéristiques héréditaires favorables à leur survie dans leur environnement. Les lois de transmission de ces caractères entre les parents et leur descendance ont ensuite été élucidées grâce aux travaux de Gregor Mendel posant les bases de la génétique. L'identification de l'ADN comme support de l'information génétique et le fondement de cette hérédité est réalisé 60 ans plus tard. En effet, en 1928, Frederick Griffith réussit à transmettre le caractère « pathogène » en transformant de l'ADN entre deux souches de la bactérie Streptococcus pneumoniae. Plusieurs décennies et générations de scientifique ont ensuite été nécessaire pour assoir cette observation, de Oswald T. Avery qui confirma l'effet transformateur de l'ADN en 1948, à Hershey et Martha Chase qui marquèrent radioactivement l'ADN et suivirent la transmission de l'information au sein de population de phages en 1952.

La caractérisation de la molécule d'ADN aussi bien au niveau de sa composition, un assemblage de 4 bases azotées complémentaires (Chargaff 1950), de sa structure double hélice antiparallèle (James Watson et Francis Crick en 1953), que de son fonctionnement identification du code génétique (Nirenberg 1960, Nirenberg et Ochoa 1966), de l'ARNm (Jacob et Monod 1961) jette ensuite les base de la génétique moléculaire.

Plus récemment le séquençage de génomes complet initié en 1995 chez Escherichia coli puis l'accélération des techniques de séquençages ont permis d'identifier et de caractériser de très nombreux génomes. Une des observations marquantes est que la taille des génomes est généralement 1000 fois supérieure à celle des cellules (ou noyaux) qui les contiennent, démontrant ainsi la nécessité de mécanismes de compaction de l'ADN. Ces problématiques globales de condensation et de structuration des chromosomes aboutissent parfois à des réponses universelles. Ainsi, l'implication des condensines, au sens large (condensine et cohésine), dans l'organisation des chromosomes semble être universelle.

Mon projet de thèse s'inscrit dans cette problématique et vise à comprendre comment le vivant parvient à équilibrer l'accessibilité de la molécule d'ADN pour les différents processus biologiques et la condensation imposée par la taille de la cellule. Plus particulièrement, il se concentre sur l'implication des condensines dans ce processus.

INTRODUCTION

A. Les complexes SMC dans le monde vivant

Le premier complexe SMC (pour Structural Maintenance of Chromosomes) a été identifié chez *Escherichia coli* au cours de travaux visant à isoler des mutants générant un pourcentage élevé de cellules anuclées. Un de ces mutants correspondait au gène mukB (muk pour mukaku en japonais) qui code une des sous-unités de la condensine MukBEF d'*Escherichia coli* (Niki et al. 1991). Plus tard, des approches similaires ont permis d'identifier chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* le gène smc1 essentiel à la ségrégation de minichromosome (Strunnikov, Larionov, et Koshland 1993). L'étude de la structure secondaire de ces deux protéines a mis en évidence une organisation similaire qui suggéra l'existence d'une nouvelle famille de protéines conservées et ubiquitaires chez les eucaryotes et les procaryotes.

De nombreux complexes SMC ont été identifiés, ces trente dernières années; ils sont ubiquitaires dans le monde vivant (Saka et al. 1994) et présentent une structure globale conservée malgré la différence des séquences primaires. Les complexes SMC assurent différentes fonctions dans le maintien et l'architecture des chromosomes dans la cellule. Les condensines et les cohésines en sont les exemples les mieux caractérisés.

Les complexes SMC ont une structure générale conservée en forme d'anneau (Anderson et al. 2002; Haering et al. 2002). Cet anneau est composé d'un dimère de SMC et d'une protéine appelée « Kléisine » (du grec « Kleisimo » qui signifie « fermeture ») qui forme un pontage entre les deux molécules du dimère de Smc et ferme la structure. Les protéines Smc se replient au niveau de leur domaine globulaire central appelé « Hinge » en entrelaçant leurs deux domaines coiled-coil de façon antiparallèle. Ce repliement place les domaines C- et –N terminaux ensemble, formant un domaine globulaire appelé « Head » et portant une activité ATPase **(Figure 1)**. Deux molécules de SMC s'associent, par une interaction au niveau de leur domaine Hinge, pour former une structure en forme de V (Uhlmann 2016). Alors que la protéine kléisine ferme la structure en anneau, des protéines accessoires s'associent à cet anneau et lui confèrent des spécificités. Par de nombreuses approches de biochimie, de microscopie électronique et de génétique, la structure de ces complexes a été prédite et plus récemment confirmée par la biologie structurale (Niki et al. 1991; Strunnikov, Larionov, et Koshland 1993; Hirano et Mitchison 1994; Saka et al. 1994; Anderson et al. 2002; Haering et al. 2002; B.-G. Lee et al. 2020; Bürmann et al. 2021).

Chez les eucaryotes, trois grandes familles de complexes SMC ont été identifiées selon leurs séquences et leurs activités :

- les condensines, généralement impliquées dans l'organisation, la condensation, la ségrégation du chromosome ainsi que dans la régulation de gènes fortement exprimés ;

- les cohésines en charge de la cohésion entre les chromatides sœurs, la ségrégation des chromosomes, la réparation de l'ADN, mais aussi la régulation de l'expression génique ou l'organisation de l'ADN en interphase ;

- le complexe SMC5-6, impliqué dans la réparation de l'ADN.

Chez les bactéries, les SMC bactériennes sont plus similaires en séquence et structure aux complexes SMC 5-6 **(Figure 1).** Elles semblent néanmoins jouer davantage un rôle de condensine et ont ainsi été dénommées condensines bactériennes.

Si l'ensemble de ces complexes garde une structure conservée, les protéines accessoires qui les composent sont diverses. Ainsi les protéines HEAT sont spécifiques des condensines et des cohésines, alors que les protéines KITE sont retrouvées associées au complexe SMC 5-6 ainsi qu'aux condensines bactériennes (Uhlmann 2016).

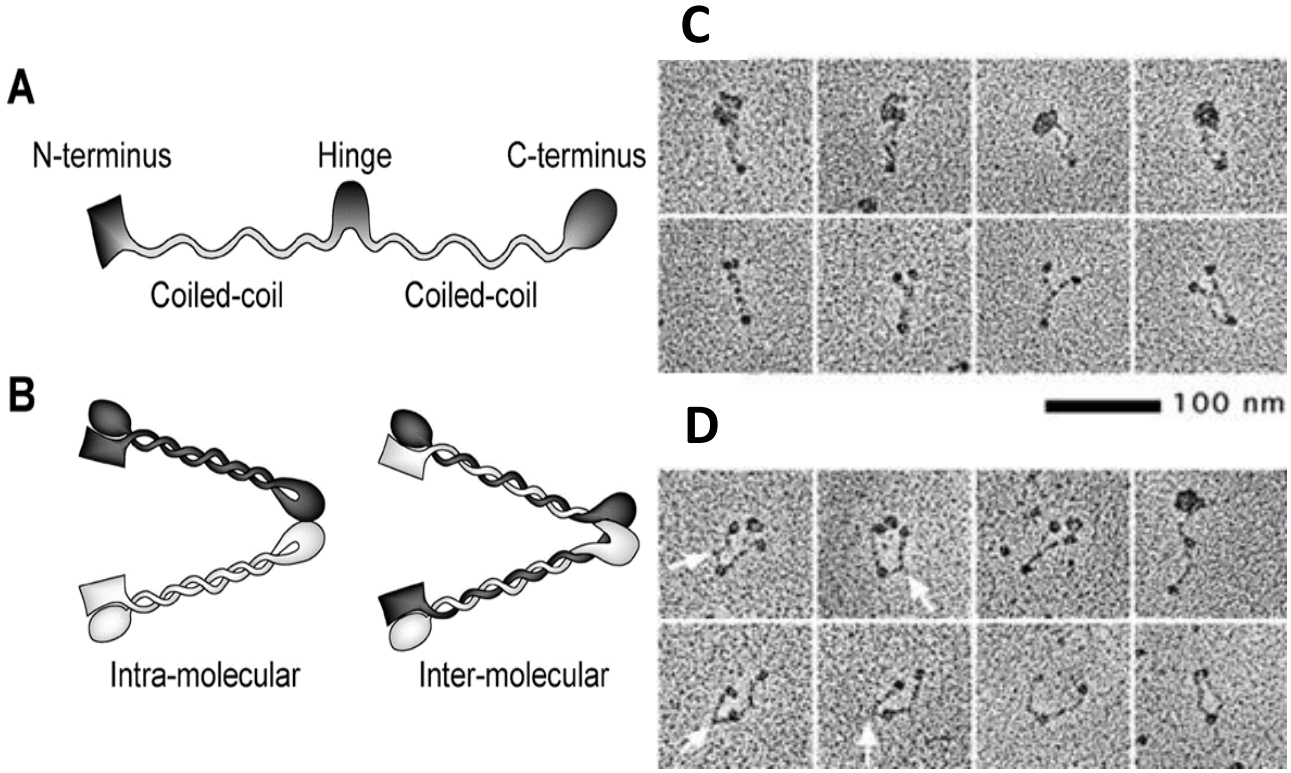
I. Les SMC eucaryotes

1. Les condensines eucaryotes

a. Structure et composition du complexe

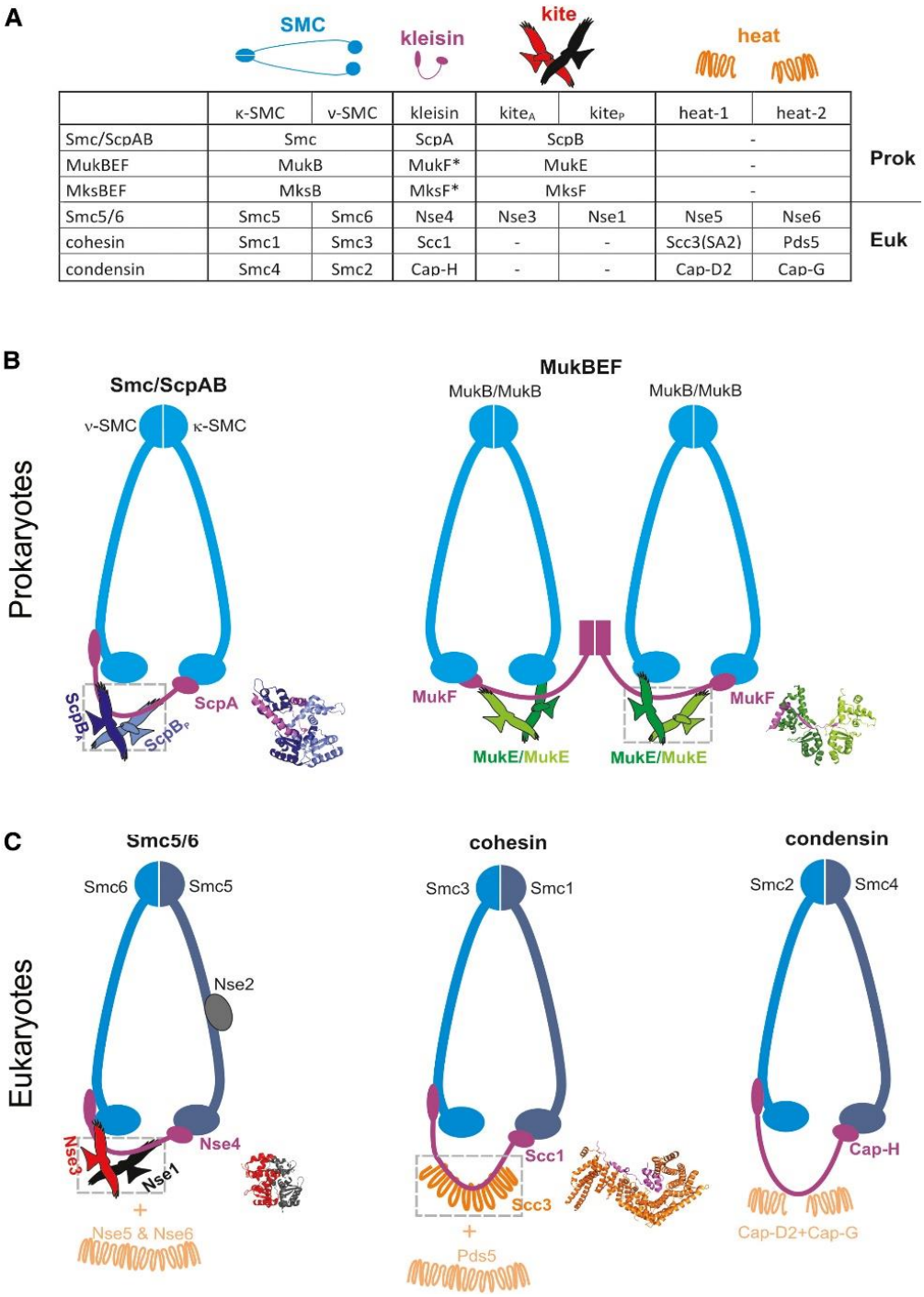
Les condensines eucaryotes sont formées principalement d'un hétérodimère SMC2/SMC4 et sont universellement présentes chez tous les eucaryotes. Alors que certaines espèces comme la levure n'en contiennent qu'un exemplaire, d'autres espèces comme les vertébrés possèdent plusieurs formes de condensines. On peut également noter que le nématode *Caenorhabditis elegans* a la particularité d'avoir trois condensines (Watrin et al. 2003; Hartl, Smith, et Bosco 2008; Yuen, Slaughter, et Gerton 2017; Walther et al. 2018).

Chez les vertébrés, il existe deux types de condensines, I et II. La différence entre les condensines de type I et II repose sur les protéines kléisine et heat qui les composent (Watrin et al. 2003; McDonel et al. 2006; Hartl, Smith, et Bosco 2008; Uhlmann 2016; Walther et al. 2018). Cela permet une régulation différentielle de leur activité. Ainsi il a été montré chez l'homme que la condensine II formée des protéines SMC2/4, de la kléisine CAP-H2, et des deux protéines HEAT CAP-D3 et CAP-G2 est toujours présente au noyau, tandis que la condensine I formée des sous-unités HEAT CAP-D2 et CAP-G est majoritairement cytoplasmique (**Figure 1 et 2)** (Ono et al. 2003).



Cohesin	Condensin	Smc5–6 complex
SMC subunits		
Smc1* (Psm1 in fission yeast)	Smc4 (Cut3 in fission yeast; CAPC in invertebrates)	Smc5
Smc3* (Psm3)	Smc2 (Cut14; CAPE)	Smc6
Kleisin		
Scc1 (Rad21)	Brn1 (Cnd2; CAPH, CAPH2)‡	Nse4 (NSMCE4)
HEAT subunits		
Scc3 (Psc3; SA1,SA2)§	Ycs4 (Cnd1; CAPD2, CAPD3)‡	Nse5 (NSMCE5)
Pds5 (PDS5A,PDS5B)§	Ycg1 (Cnd3; CAPG, CAPG2)‡	Nse6 (NSCME6)
Others		
Wapl		Nse1–Nse3 (NSMCE1–NSCME3) ubiquitin ligase
Sororin‖		Mms21 (Nse2; NSCMCE2) SUMO ligase

Figure 1 : Les complexes SMC eucaryotes.
(A) Schéma de la structure générale des protéines SMC, avec les domaines qui les constituent (Cobbe et Heck 2004). (B) Modèles de structure des dimères de condensines. (C) et (D) Photos de microscopie électronique de la condensine et de la cohésine de Xenopus respectivement (Anderson et al. 2002). (D) Tableau des sous-unités qui constituent les complexes SMC eucaryotes tiré de (Uhlmann 2016).



	κ-SMC	ν-SMC	kleisin	kite$_A$	kite$_P$	heat-1	heat-2	
Smc/ScpAB	Smc		ScpA	ScpB		-		Prok
MukBEF	MukB		MukF*	MukE		-		Prok
MksBEF	MksB		MksF*	MksF		-		Prok
Smc5/6	Smc5	Smc6	Nse4	Nse3	Nse1	Nse5	Nse6	Euk
cohesin	Smc1	Smc3	Scc1	-	-	Scc3(SA2)	Pds5	Euk
condensin	Smc4	Smc2	Cap-H	-	-	Cap-D2	Cap-G	Euk

Figure2 : Complexes SMC : similitudes et différences architecturales.

(A) Sous unités des complexes SMCs chez les procaryotes et les eucaryotes (les sous unités de la condensine II ne sont pas dans le tableau).

(B) Schémas représentatifs des SMC/MukB procaryotes

(C) Schémas représentatifs des SMCs eucaryotes (Palecek et Gruber 2015).

b. Rôle des condensine I et II

La condensine II qui s'accumule sur le chromosome en prophase forme des boucles d'ADN d'environ 450 kb (Walther et al. 2018) et assure la condensation du chromosome. Lors de la dégradation de l'enveloppe nucléaire, la condensine I a alors accès au chromosome et permet en association avec la condensine II **(Figure 3)**, la formation d'un chromosome ultra-condensé : le chromosome métaphasique. Des expériences d'immunofluorescence réalisées chez *Xenopus laevis* montrent que les deux condensines forment un corps protéique au centre du chromosome, entouré d'ADN lors de la métaphase (Ono et al. 2003; Gibcus et al. 2018). Des analyses d'imagerie en super résolution STED confirment ces observations et suggèrent un modèle dans lequel la condensine II occupe une position au centre du chromosome entouré de la condensine I. Chez l'homme, il a également été proposé qu'après la dégradation de l'enveloppe nucléaire, la condensine I se charge sur les grandes boucles formées par la condensine II et les réduisent à des boucles de 70 à 90 kb (Walther et al. 2018). Des approches récentes de microscopie et de capture de conformation chromosomique (3C ou HiC) ont confirmé l'existence de deux niveaux de structuration. Le premier est assuré par la condensine II induisant des interactions de segment de chromosome distant de 10 kb à 5Mb, et le second est assuré par la condensine I induisant des contacts distants de plus de 5 Mb (Gibcus et al. 2018).

c. Régulation des condensines eucaryotes

Les condensines I et II ont des effets différents sur le chromosome, dû à leur composition différente mais également en raison de régulations à différents niveaux. Chez la souris, la formation du complexe de la condensine II est inhibée durant l'interphase par MCPH1, MCPH1 interagissant avec la kléisine NCAPG2 et empêchant son interaction avec SMC2 **(Figure 2)** (Houlard et al. 2021). Chez *Xenopus laevis*, une modification du taux d'expression des condensines (5 condensine I pour une condensine II) change les propriétés structurales et mécaniques du chromosome (Hirano et Mitchison 1994; Ono et al. 2003).

De nombreux autres acteurs modulent l'activité des condensines notamment par phosphorylation de certains résidus. L'activité des condensines I et II est régulée durant le cycle cellulaire par différentes protéines kinases ; ainsi la condensine I chez l'homme subit des phosphorylations par la Casein Kinase II qui inhibe son activité durant l'interphase (Takemoto et al. 2004). A l'inverse chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*, l'hyperphosphorylation de SMC4 par la Polo kinase CDK/PLK1/Cdc5 (St-Pierre et al. 2009), ou la phosphorylation de la condensine I (hCAP-C, hCAP-D2, hCAP-G, et hCAP-H)(Takemoto et al. 2006) par la voie

CDK/PLK1 chez *X. laevis* stimule l'activité de ces condensines. La kinase "Aurora B-like kinase" est un autre facteur majeur de la régulation de l'activité de condensation et d'association au chromosome des condensines, et ce facteur est retrouvé dans plusieurs espèces, telles que *S. pombe* (Morishita et al. 2001), *Drosophila schneider* (Giet et Glover 2001) et l'homme (Lipp et al. 2007). Pour avoir un aperçu global des modifications post-traductionnelles subies par les condensines,(Bazile, St-Pierre, et D'Amours 2010) ont détaillé les sites phosphorylés durant le cycle cellulaire et l'impact de ces phosphorylations sur l'activité des condensines et la structuration du chromosome mitotique. Ils ont ainsi pu identifier que la majorité de ces modifications sont regroupées au niveau des régions ATPase-kléisine-HEAT de la condensine, suggérant que la cible majeure de cette régulation portait sur la modification de l'activité ATPase.

Il est aussi important de noter qu'on retrouve un enrichissement des condensines II au niveau des centromères, des télomères et des régions fortement exprimées comme les ADNr, les ADNt et également les gènes de ménage transcrit par l'ARN Pol II (ce qui permet la bonne ségrégation de ces séquences durant la mitose). Il est aussi possible que la topologie de l'ADN dans ces régions favorise le chargement de la condensine II (Yuen, Slaughter, et Gerton 2017). De plus, certains facteurs de transcription tel que TFIIIC, qui reconnait les promoteurs des ARNt et interagit avec la kléisine de la condensine II, participent au chargement de la condensine II. Ce chargement dépend à la fois de la présence de TFIIIC mais également de marques épigénétiques tel que H3K4me3 **(Figure 4)** (Guacci, Hogan, et Koshland 1994; Iwasaki et al. 2015; Yuen, Slaughter, et Gerton 2017).

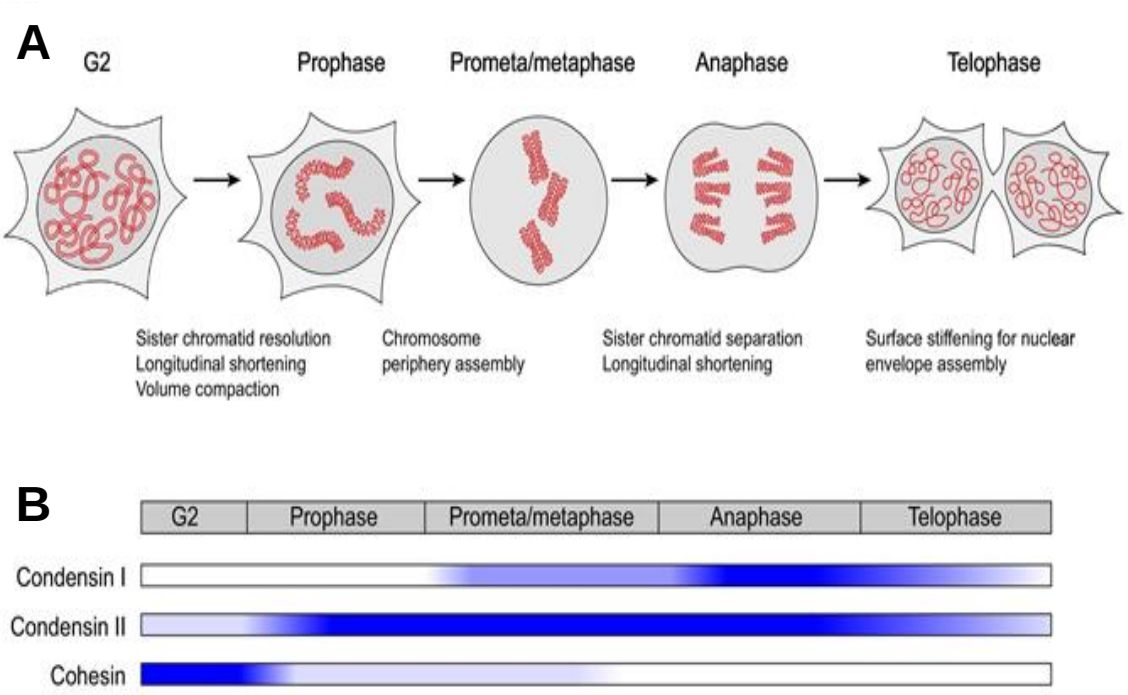
Le déchargement des condensines est une étape nécessaire permettant de passer d'un chromosome métaphasique hyper-condensé à un chromosome relâché en télophase. Le chromosome métaphasique étant particulièrement compact, le déchargement des condensines nécessite l'action de remodeleurs de chromatine. Ainsi il a été montré chez la levure que Cdc48, un remodeleur de chromatine possédant une activité ATPase, associé aux protéines Ufd1-Npl1, décharge les condensines ubiquitinylées (Guacci, Hogan, et Koshland 1994; Doughty, Arsenault, et Benanti 2016; Gibcus et al. 2018; Thattikota et al. 2018).

d. Extrusion des boucles d'ADN par la condensine

Le modèle structural du chromosome mitotique proposé par (Walther et al. 2018) propose que

Figure 3 : Schéma de la réorganisation chromosomique durant une partie du cycle cellulaire.
(A) Illustration de la topologie de l'ADN (rouge), (B) représentation de l'abondance chromosomique des condensine I, II et de la cohésine durant le cycle cellulaire. Le bleu foncé correspond à l'abondance élevée. Adapté de (Walther et al. 2018).

les condensines soient capables de former des boucles d'ADN. D'autres études *in vitro* ont caractérisé l'activité des condensines. Ainsi au début des années 2000, il a été montré que les



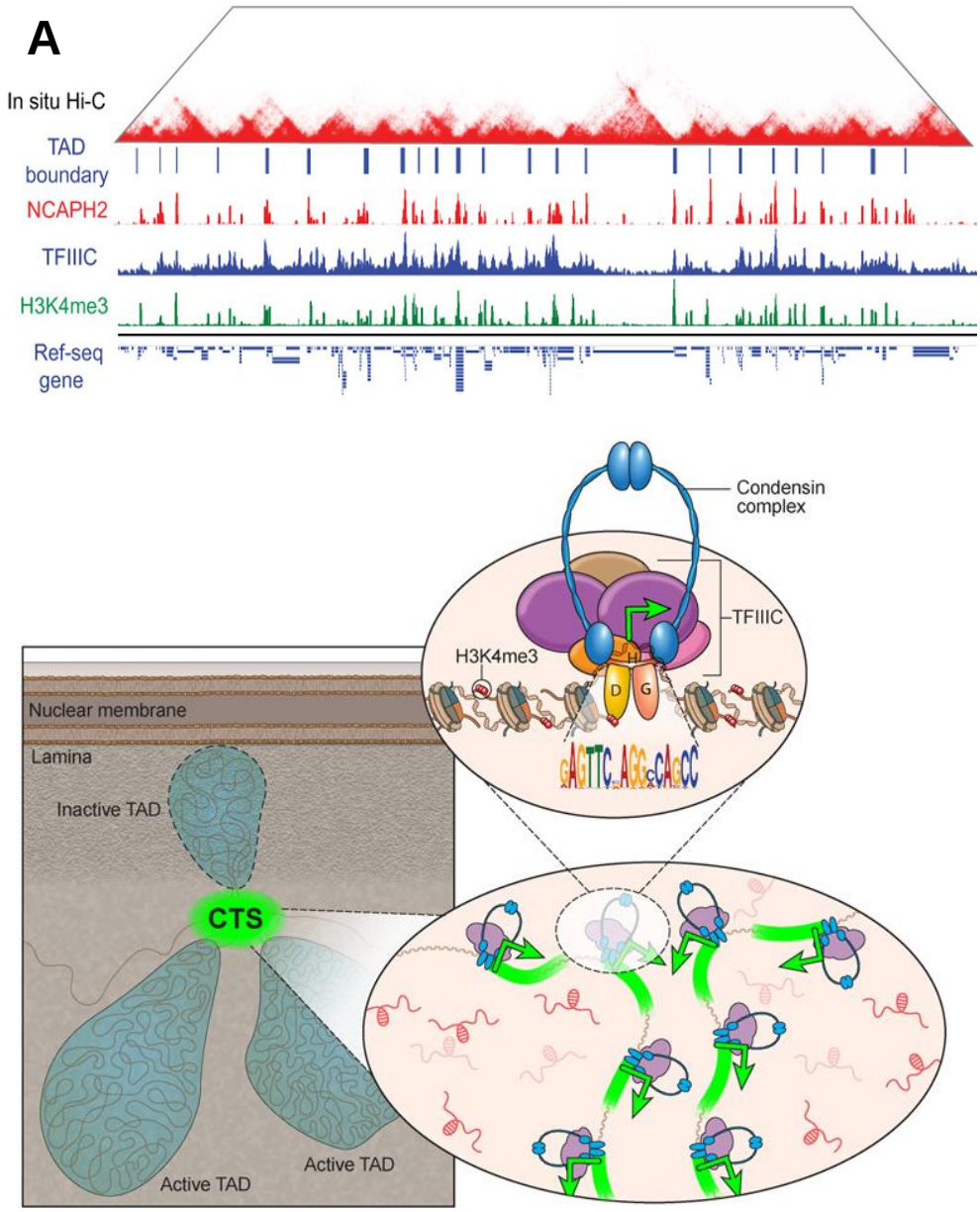


Figure 4 : Chargement de la condensine II sur le chromosome
(A) Image représentative de la colocalisation de la Condensine II, de TFIIIC et de H3K4me3 sur le génome des cellules mESC de souris. La figure montre la matrice Hi-C, les limites des TAD et le ChIP-seq sur NCAPH2, TFIIIC et H3K4me3. (B) Image représentative du chargement de la Condensine II et de l'impact sur l'organisation chromosomique, y compris la formation des TAD et l'expression génétique (Yuen, Slaughter, et Gerton 2017).

condensines de *X. laevis* et de *C. elegans* étaient capables d'introduire du surenroulement positif sur un plasmide, d'une manière dépendante de l'ATP (Kimura et Hirano 1997; Hagstrom et al. 2002), suggérant que ces complexes formaient de larges boucles. Récemment, la démonstration de la formation de ces boucles *in vitro* a été faite par une approche de molécule unique; l'accrochage de la condensine de *S. cerevisiae* **(Figure 5 A)** sur un ADN linéaire induit la formation de boucle en présence d'ATP, visible en microscopie à haute résolution. L'extension de cette boucle est asymétrique et s'effectue à une vitesse de 1500 pb par seconde (Ganji et al. 2018) **(Figure 5 B)**. D'autres études, basées elles aussi sur des approches *in vitro* et *in silico,* si elles ne remettent pas en cause la capacité de la condensine à former des boucles, proposent des mécanismes d'extrusion symétrique (Banigan et al. 2020; Kong et al. 2020).

Malgré ces différents travaux, il n'y a pour l'instant pas de consensus clair sur le mode d'action moléculaire des condensines, non seulement sur leur façon d'extruder des boucles mais également sur leur manière d'interagir avec l'ADN (Ganji et al. 2018; Walther et al. 2018; Davidson et Peters 2021; Nomidis et al. 2022; Shaltiel et al. 2022) **(Figure 5 C).**

2. Les cohésines eucaryotes

Les cohésines comme les condensines sont présentes chez tous les eucaryotes. On distingue deux catégories : les cohésines mitotiques et les cohésines méiotiques. Ces deux types de cohésines diffèrent par le processus cellulaire dans lequel elles sont impliquées mais également par leur composition. En effet, les cohésines sont constituées d'un hétérodimère des protéines SMC1 (SMC1α pour les cohésines mitotique ou SMC1β pour les cohésines méiotique) et SMC3 avec lequel s'associe une kléisine pour former un anneau de 50nm de diamètre (Anderson et al. 2002). Les sous-unités kléisine et HEAT diffèrent également selon la catégorie de cohésine (mitotique ou méiotique) **(Figure 6)**.

a. La cohésine mitotique

La cohésine mitotique est constituée d'une sous-unité kléisine SCC1/Rad21 (Haering et al. 2002), et de deux sous unités HEAT SA1 ou SA2 (Stromalin Antigens 1 et 2) (Losada et al. 2000; Sumara et al. 2000) et Pds5 A ou B **(Figure 6 A)**. La combinaison de ces différentes sous-unités permet la formation de 4 types de cohésines mitotiques (SA1/SA2-Pds5A/Psd5B). Le pourcentage de chaque variant de cohésine est spécifique du type cellulaire et/ou du stade du développement (Losada 2014). Ces différentes variantes ont des fonctions différentes ; ainsi

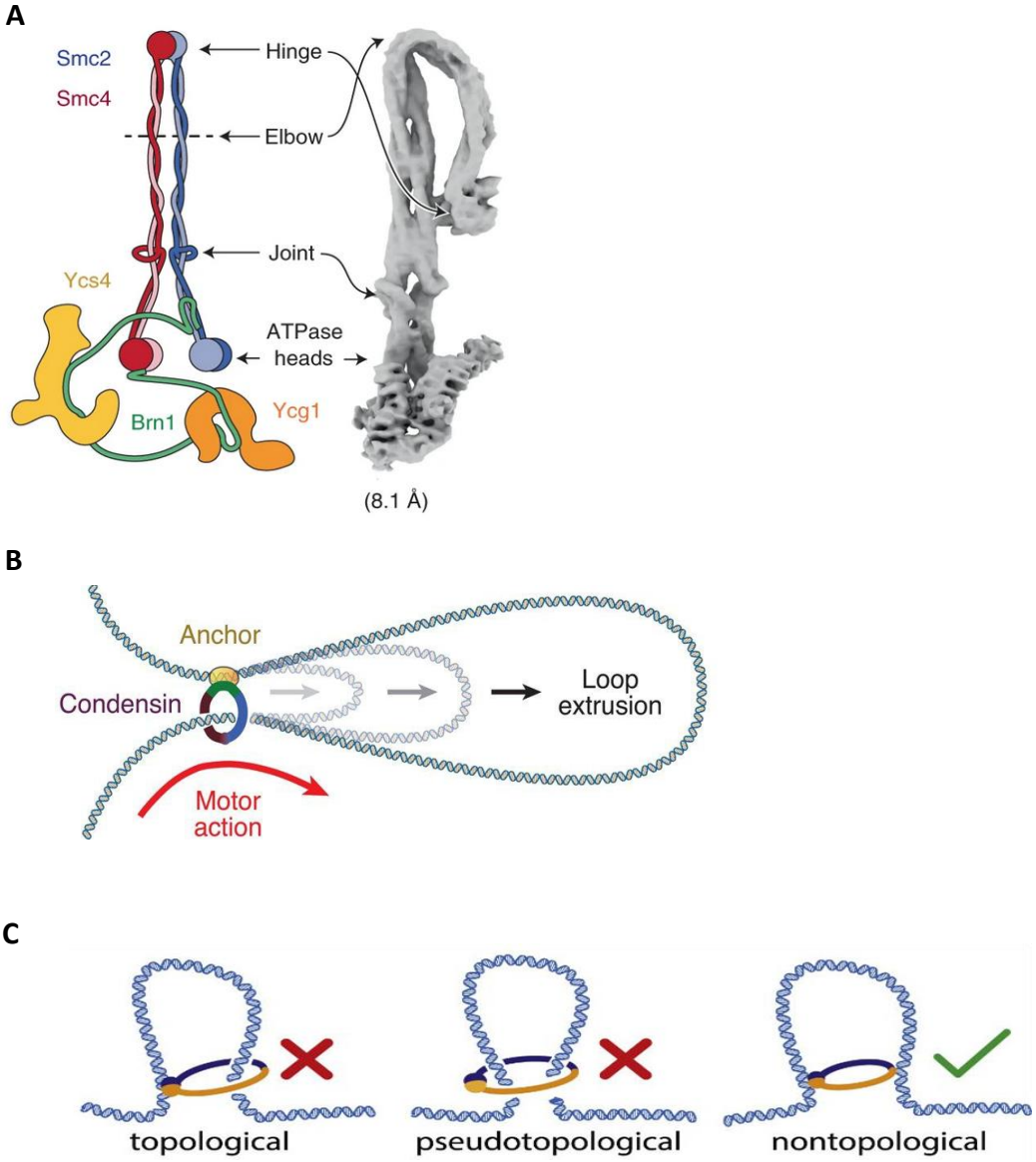
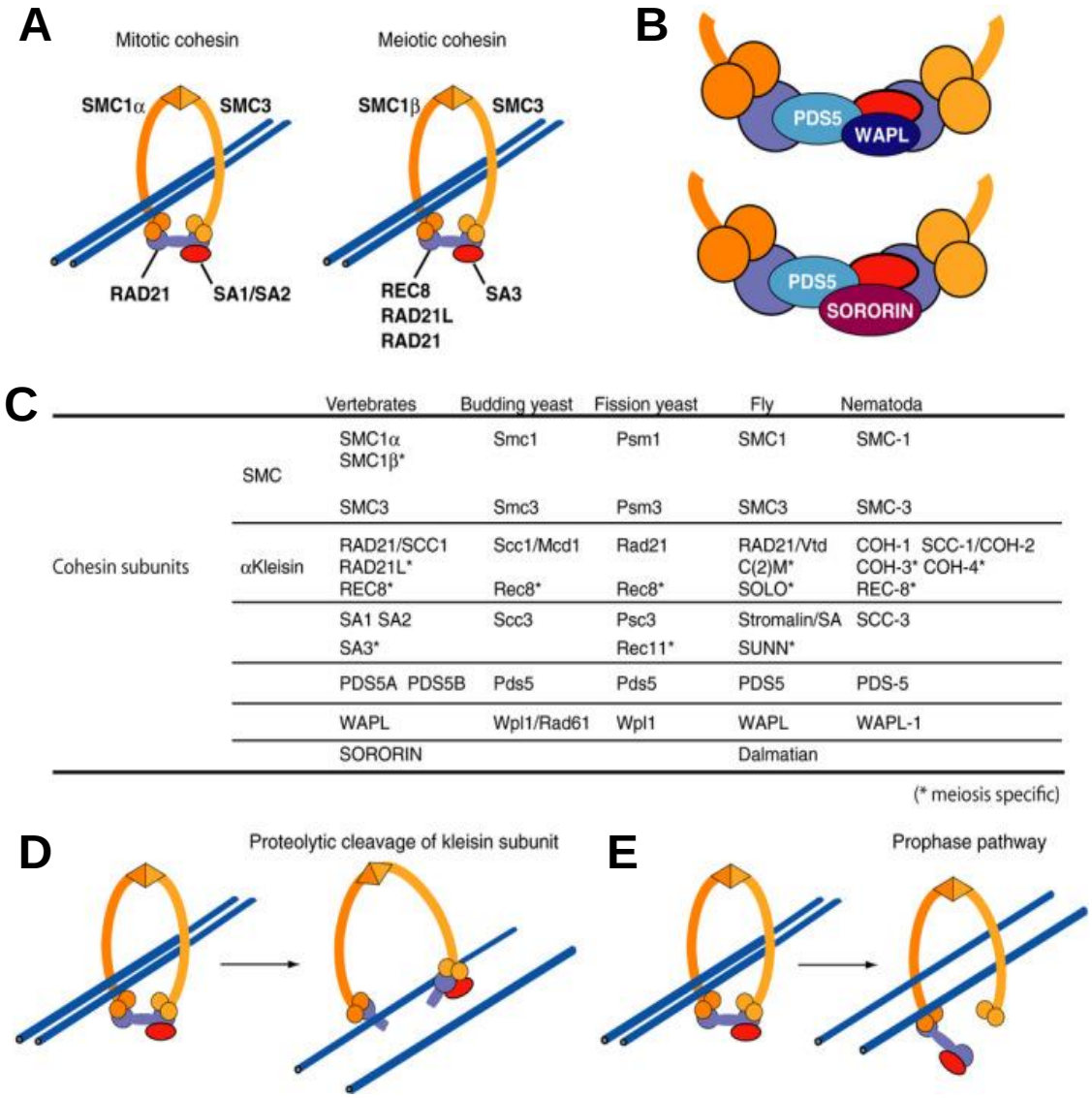


Figure 5 : Structure de la condensine *de S. cerevisiae* et ces modes d'actions sur l'ADN.
(A) Modèle schématique de la condensine *de S. cerevisiae* associé à une image de la structure 3D à la résolution de 8.1-Å (B.-G. Lee et al. 2020).
(B) Schéma de l'extrusion des boucles par la condensine de *S. cerevisiae* (Ganji et al. 2018),
(C) Schéma des modèles d'activité de condensine (Pradhan et al. 2022).



		Vertebrates	Budding yeast	Fission yeast	Fly	Nematoda
Cohesin subunits	SMC	SMC1α SMC1β*	Smc1	Psm1	SMC1	SMC-1
		SMC3	Smc3	Psm3	SMC3	SMC-3
	αKleisin	RAD21/SCC1 RAD21L* REC8*	Scc1/Mcd1 Rec8*	Rad21 Rec8*	RAD21/Vtd C(2)M* SOLO*	COH-1 SCC-1/COH-2 COH-3* COH-4* REC-8*
		SA1 SA2 SA3*	Scc3	Psc3 Rec11*	Stromalin/SA SUNN*	SCC-3
		PDS5A PDS5B	Pds5	Pds5	PDS5	PDS-5
		WAPL	Wpl1/Rad61	Wpl1	WAPL	WAPL-1
		SORORIN			Dalmatian	

(* meiosis specific)

Figure 6 : La cohésine durant la mitose et la méiose.

(A) Les deux chromatides sœurs en bleu sont maintenues ensemble par les cohésines mitotiques et méiotiques.

(B) La représentation schématique montre comment les éléments de la cohésine se lient ensemble lors du chargement de la cohésine avec SORORIN-PDS5B et lors de son dechargement grace à WAPL et PDS5.

(C) Les sous-unités de la cohésine sont conservées au cours de l'évolution, et une liste de ces sous-unités trouvée dans différentes espèces est présenté.

(D) La Kléisine est clivée par la Séparase lors de la ségragation des chromatids soeurs.

(E) WAPL facilite la dissociation de la cohésine Durant la prophase, par un mécanisime indépendant du clivage par Séparase (Ishiguro 2019).

il a été montré que chez l'homme, l'absence de l'une des deux variantes de cohésine induit des effets spécifiques sur l'architecture chromosomique et l'expression génique (Kojic et al. 2018).

Le chargement des cohésines sur l'ADN est un phénomène actif assuré par des protéines spécifiques tel que le complexe NIPBL–MAU2 chez l'homme (durant la phase G1), qui entre en compétition avec un mécanisme de déchargement où la protéine WAPL (pour Wings Apart-Like protein) s'associe à Pds5 et décharge la cohésine du chromosome. De ce fait, le taux de cohésine restant sur le chromosome représente l'équilibre entre l'activité des deux complexes NIPBL-MAU2 et Pds5-WAPL (Gandhi, Gillespie, et Hirano 2006; Kueng et al. 2006).

Lors du passage de la fourche de réplication, la cohésine encercle les deux chromatides sœurs assurant ainsi leur cohésion. La liaison de la cohésine sur l'ADN est stabilisée par différents acteurs. En phase S, les protéines Eco1 et/ou Eco2 acétylent SMC3, ce qui permet le recrutement de la protéine Sororin. Le recrutement de Sororin au complexe s'effectue également grâce à une interaction avec Pds5; Soronin stabilise la cohésine en empêchant l'interaction de Pds5 avec WAPL nécessaire à son déchargement (Nishiyama et al. 2010). Il a ainsi été montré par des expériences de FRAP (Fluorescence Recovery After Photobleaching) en phase G2 que les cohésines stabilisées représentent 30% de la population et que leur temps de résidence sur le chromosome passe de 16 ± 5 min en phase G1 à 6.3 ± 3.7 heures après stabilisation en phase G2 (Gerlich et al. 2006). Néanmoins la majorité des cohésines ne sont pas acétylées ; Pds5-WAPL dissocie ces cohésines du chromosome et crée ainsi une population de cohésine libre, qui se recharge à nouveau.

En prophase, la phosphorylation de SORONIN par la voie CDK1/PLK1 déstabilise son interaction avec Pds5 et rend les cohésines sensibles à l'activité de WAPL ; ce processus est restreint au niveau des bras des chromosomes. Au niveau des centromères, SORONIN est protégé de la phosphorylation par la phosphatase 2A et Shugoshin (Sgo1), ce qui permet de maintenir les chromatides sœurs jusqu'à la ségrégation (Wendt et al. 2008; Makrantoni et Marston 2018).

Durant la transition métaphase-anaphase, la séparase est activée ; la séparase clive la sous-unité kléisine dissociant les cohésines et les déchargeant du centromère (Waizenegger et al. 2000) **(Figure 6 et 7)**.

b. La cohésine méiotique

Les cohésines méiotiques sont essentielles à l'obtention d'une méiose correcte et la délétion des sous-unités qui les composent induit des phénotypes de stérilité chez les mammifères,

associés à des anomalies chromosomiques (exemple de délétion de SMC1 β (Revenkova et al. 2004), et STAG 3 (SA3) (Winters, McNicoll, et Jessberger 2014)) **(Figure 6 A)**.

La cohésine méiotique et la cohésine mitotique ont la même structure globale, mais diffèrent dans les sous unités qui les composent. Les sous unités particulières de la cohésine méiotique sont : SMC1 β, la kléisine REC8 ou RAD21L et la sous unité HEAT SA3. Chez les mammifères, il existe trois types de cohésines méiotiques, qui diffèrent dans leurs fonctions, et qui sont caractérisées par leur sous-unité kléisine REC8, RAD21L or RAD21 (Ishiguro et al. 2011; J. Lee et Hirano 2011). Les mécanismes globaux de chargement/déchargement des cohésines méiotiques sont similaires à ceux des cohésines mitotiques. En effet, comme les cohésines mitotiques, les cohésines méiotiques sont soumises à une dynamique de chargement/déchargement *via* WAPL (Brieño-Enríquez et al. 2016) ou la séparase (Uhlmann et al. 2000; Gerlich et al. 2006). Néanmoins, des expériences de microscopie ont montré que la cohésine-REC8 et la cohésine–RAD21L adoptaient des localisations exclusives, ce qui suggère que les cohésines méiotiques reconnaissent grâce à leurs kléisines des sites spécifiques de chargement sur le chromosome méiotique (Ishiguro 2019) **(Figure 6 et 7)**.

c. Fonction et mode d'action des cohésines

Les fonctions des cohésines sont nombreuses, et elles dépendent de leur composition, des modifications post-traductionnelles qu'elles subissent et du stade cellulaire dans lequel elles interviennent. En effet, chez *S. cerevisiae* et *D. melanogaster*, la réduction de l'abondance des cohésines n'affecte pas drastiquement la cohésion, mais des fonctions telles que la réparation de l'ADN, la condensation du chromosome et l'expression des gènes (Schaaf et al. 2009; Heidinger-Pauli et al. 2010). On peut retrouver d'autres exemples d'activité "non-cohésive" des cohésines dans différents systèmes (Hadjur et al. 2009; Mishiro et al. 2009; Nativio et al. 2009; Kagey et al. 2010).

Durant l'interphase, en absence de cohésines, le chromosome adopte une organisation en compartiments A et B, où les compartiments A et B correspondent aux domaines exprimés et réprimés du chromosome (Lieberman-Aiden et al. 2009). Grâce à une activité de formation et d'extrusion de boucles d'ADN, les cohésines permettent d'individualiser les chromosomes afin de les ségréger plus facilement, mais aussi de réguler l'expression des gènes, de répliquer et réparer l'ADN **(Figure 7 et 8)**.

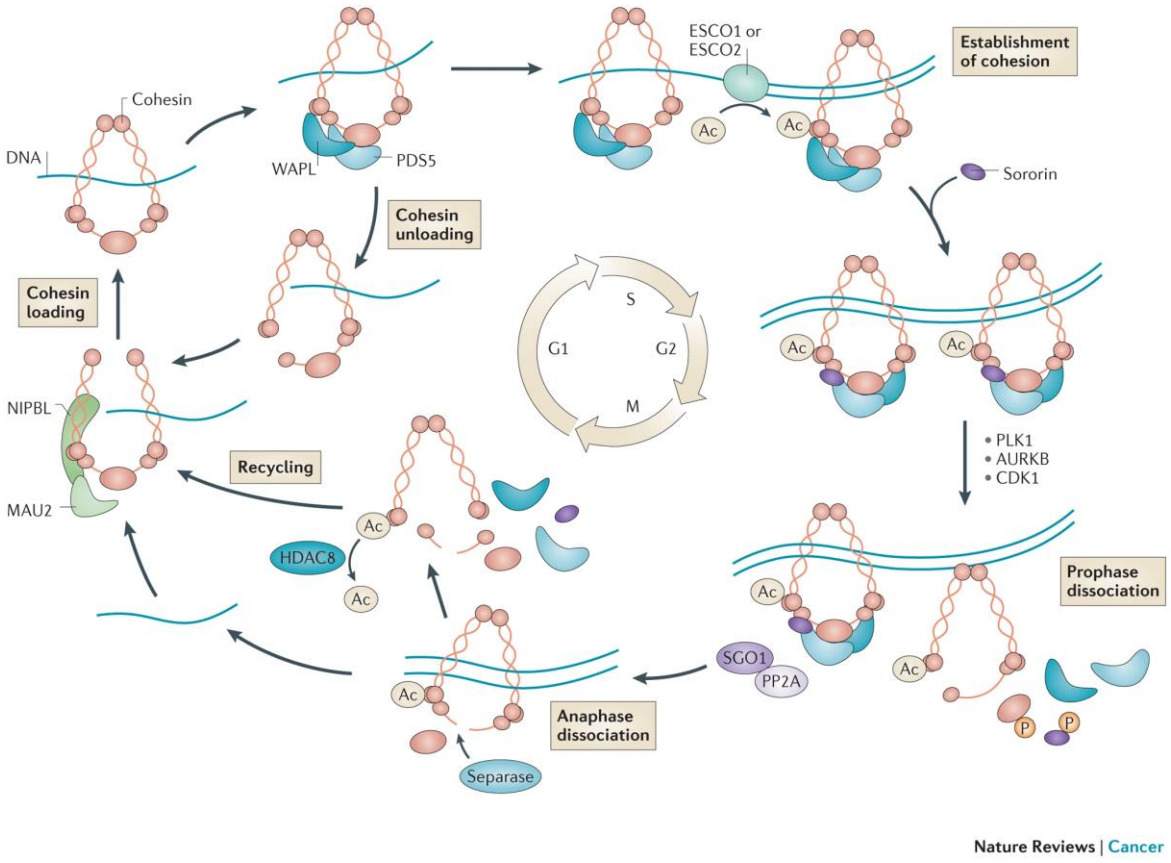


Figure 7 : Schéma représentatif de la régulation de la composition de la cohésine durant le cycle cellulaire

La structure de base en orange: dimerSMC1/3, Klésine SCC1 et HEAT SA1 ou SA2

AC: acétylation, cette modification qui touche SMC3 est essentielle pour l'activité cohésive de la cohésine.

P: phosphorylation de Sororin et SA1/2 permet de dissocier la cohésine lors de la ségrégation chromosomique (Losada 2014)

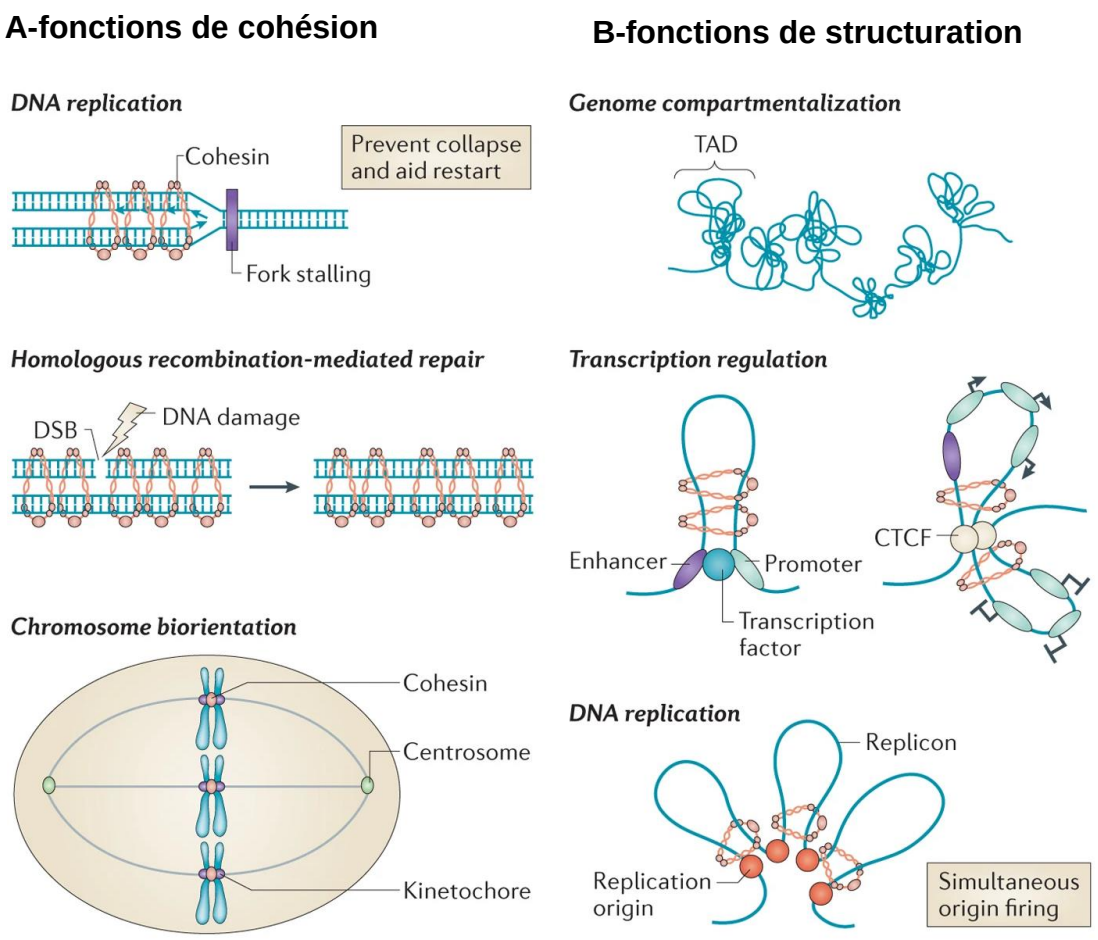


Figure 8 : Schéma représentatif de la diversité des fonctions assurées par la cohésine durant le cycle cellulaire.
(A) les fonctions cohésives de la cohésine régulent la réplication, la réparation de l'ADN et la ségrégation chromosomique.
(B) les fonctions de structuration -non cohésives- assure la conformation chromosomique durant l'interphase. (Losada 2014).

d. Extrusion de boucles d'ADN par la cohésine

La formation de boucles d'ADN par les cohésines a été observée *in vitro,* par microscopie à haute résolution, et leur extrusion se fait de façon symétrique et est dépendante de l'ATP (Davidson et al. 2019; Kim et al. 2019). Les cohésines sont également capables de former des boucles en présence de nucléosomes (11nm), ce qui suggère qu'elles sont capables de passer ces obstacles (Clarkson et al. 2019; Pradhan et al. 2022). L'extrusion de ces boucles *in vitro* se fait à une vitesse de 0.5 kb/s (Kim et al. 2019), ou 2.1 kb/s (Davidson et al. 2019), similaire à la vitesse de la condensine de levure (1.5 kb/s).

In vivo, plusieurs études basées sur des techniques de capture de conformation de chromosome ou de ChIP-seq ont permis d'identifier la formation de ces boucles et leur association avec les cohésines. Ainsi chez l'homme, il a été montré que l'induction de la dégradation de la sous-unité kléisine SCC1, induit la diminution des contacts de 100kb à 10Mb, la diminution du nombre des boucles, et l'apparition des contacts très lointains >2Mb (en *cis* et en *trans*) ce qui suggère une réorganisation du chromosome en une structure de compartiment A et B (Wutz et al. 2017).

Durant l'interphase, l'étude de la conformation chromosomique par la technique de HiC chez les eucaryotes a montré que les chromosomes sont structurés sous forme de sous-domaines de l'ordre du mégabase (Mb), appelé TADs (Topological Associated Domain) (Rowley et Corces 2018). Des expériences de FISH (hybridation fluorescente de l'ADN in situ) confirment ces observations et montrent que la colocalisation des loci à l'intérieur d'un TAD est plus fréquente qu'entre loci appartenant à différents domaines (Eskeland et al. 2010).

e. Formation de domaines et TADs

Les cohésines, de par des contacts intrachromosomiques et les boucles qu'elles génèrent, assurent une fonction de structuration du chromosome en TADs, s'ajoutant à la structuration du chromosome en compartiments A et B (Wutz et al. 2017; Rowley et Corces 2018).

Un TAD est un domaine de 0.2 à 1 Mb observable sur les cartes de contact dérivées des expériences de HiC. Les TADs sont caractérisés par une forte fréquence d'interactions des séquences d'une même région chromosomique délimitée par des bordures qui jouent un rôle d'isolement des éléments génétiques extérieurs (Wutz et al. 2017; Rowley et Corces 2018; Beagan et Phillips-Cremins 2020; Ong et Corces 2014). Ainsi on retrouve une forte corrélation dans l'expression génique entre les gènes de chaque TAD, tel que l'exemple de l'organisation

du locus β-Globine chez les mammifères (Noordermeer et de Laat 2008) et d'autres (Hadjur et al. 2009; Kagey et al. 2010).

Les boucles d'ADN sont également affectées par le temps de résidence de la cohésine sur l'ADN, et cela a été observé chez des mutants WAPL et/ou Pds5 qui forment des boucles plus larges que celles observées chez un organisme sauvage (Wutz et al. 2017).

CTCF est un des facteurs les plus importants et le mieux décrit qui module l'action de la cohésine. CTCF est une protéine qui contient 11 domaines "doigt de Zinc" qui lui permettent de se fixer sur des séquences 5′-CCACNAGGTGGCAG-3′ d'ADN chez la souris. Les premiers travaux sur CTCF ont montré que la protéine se fixe sur l'ADN riche en CTC, d'où le nom de la protéine CTCF pour « CCCTC-binding Factor » (Phillips et Corces 2009; Guelen et al. 2008; Handoko et al. 2011). La protéine CTCF est conservée chez les animaux, mais absente chez les plantes, *C. elegans* et la levure (Heger et al. 2012). Des expériences de génétique et de HiC ont montré que la délétion ou l'inversion des sites CCCTC impacte la formation des TAD (Narendra et al. 2015). De plus, l'étude des matrices de HiC suggère l'existence d'éléments génomiques sur les bordures des TAD ; ces éléments affectent la conformation chromosomique définissant la taille des domaines et des boucles faites par la cohésine (Wutz et al. 2017). La comparaison entre les résultats obtenus par HiC chez l'homme et le résultat de ChIP-seq de CTCF montre un enrichissement de CTCF au niveau des bordures des TADs **(Figure 8 B)**. Il est à noter que la délétion de CTCF n'affecte ni la capacité de la cohésine à former des boucles, ni son abondance sur l'ADN mais modifie sa distribution sur le chromosome (Busslinger et al. 2017; Nora et al. 2020).

L'observation des sites CCCTC montre que CTCF reconnaît un motif de séquence non symétrique, ce qui suggère que l'orientation des sites CTCF est importante. Il a été montré par HiC que les sites CTCF qui interviennent dans la formation des TADs sont convergents (Rao et al. 2014); en effet l'analyse de l'enrichissement de la cohésine montre que seul 15% des sites CTCF sont impliqués dans la rétention des cohésines (Busslinger et al. 2017). Le modèle d'action proposé pour CTCF est le suivant : la formation de la boucle est bloquée lors de l'interaction de deux CTCF convergents à la base de la boucle. Ce processus maintient la boucle et la cohésine sur l'ADN, d'où l'enrichissement de la cohésine au niveau des sites CTCF. Chez la souris des expériences de génétique, de HiC, de ChIP et de microscopie à haute résolution (molécule unique *in vivo*) montrent que l'inversion des sites repositionne l'ancrage des boucles (de Wit et al. 2015) et que le domaine N-terminal de CTCF est important dans l'efficacité d'isolement de la boucle (Pugacheva et al. 2020; Nora et al. 2020). La délétion du domaine N-

Terminal de CTCF maintient la colocalisation avec la cohésine, mais l'enrichissement de la cohésine diminue (Nora et al. 2020). Le domaine N-terminal de CTCF a fait l'objet de plusieurs études, et des expériences *in vitro* montrent que le domaine N-terminal de CTCF interagit avec RAD21–SA2 (sous-unité HEAT de la cohésine) et assure leur colocalisation *in vivo* (Pugacheva et al. 2020; Li et al. 2020). De plus le domaine N-terminal de CTCF interagit avec la protéine Pds5 grâce à son domaine "Zinc Finger", domaine partagé avec WAPL et SORORIN, empêchant ces deux derniers modulateurs de la cohésine d'agir et la stabilisant au site CTCF (Nora et al. 2020). Ces résultats obtenus par différentes approches montrent que le domaine N-terminal de CTCF est essentiel à la formation des TADs (Nora et al. 2020; Pugacheva et al. 2020; Nishana et al. 2020).

D'autres facteurs peuvent bloquer la progression de la cohésine, figer des boucles et ainsi former des TADs indépendamment de CTCF. Il a été également montré par ChIP-seq de l'ARN Pol II et Gro-seq (Global run-on sequencing) sur les ARNs en cours de transcription que les bordures des TADs sont souvent associées avec des sites de démarrage de transcription (TSSs pour « Transcription Start Site ») des gènes de ménages et des gènes des ARNt (Wutz et al. 2017). Ces résultats obtenus chez l'homme et la souris suggèrent une forte association entre la formation des bordures et l'expression génique, ce qui suggère qu'un niveau de transcription particulièrement élevé pourrait également bloquer la progression des cohésines.

II. Les SMC bactériens

Les complexes SMC sont également ubiquitaires chez les bactéries (Niki et al. 1991; Hirano et Mitchison 1994; Cobbe et Heck 2004; Yoshinaga et Inagaki 2021). Il en existe trois types : Smc-ScpAB, MukBEF et MksBEF. Bien qu'ils adoptent une même structure en anneau, ils diffèrent structurellement les uns des autres par la taille des bras des sous-unités Smc **(Figure 2)** (Niki et al. 1991; Cobbe et Heck 2004; Melby et al. 1998; Petrushenko, She, et Rybenkov 2011). L'impact de ces complexes sur la ségrégation et la conformation du chromosome est extrêmement variable selon les organismes (Lioy et al. 2020) ; ils sont néanmoins dénommés collectivement condensines bactériennes.

Les expériences de génétique et de biochimie ont montré que la taille des bras des condensines (régions coiled-coil) est essentielle pour leurs fonctions (Bürmann et al. 2017). Ces résultats rendent compte de la conservation de la taille des régions coiled-coil des Smc eucaryotes (condensine et cohésine) ou procaryotes. Des expériences réalisées chez *B. subtilis* montrent

que certains raccourcissements ou allongements de la taille des régions coiled-coil de Smc-ScpAB peuvent maintenir la fonctionnalité de la condensine ; l'addition ou la délétion d'une centaine de résidus produit des SMC fonctionnelles. De manière remarquable, les tailles tolérées avec Smc-ScpAB correspondent aux tailles observées chez les trois condensines bactériennes (Smc-ScpAB, +100 aa pour MukBEF, -100 aa pour MksBEF) ainsi qu'à celle des Smc eucaryotes (même taille que la protéine Smc procaryote). Les mutants Smc-ScpAB non fonctionnels hydrolysent l'ATP, se chargent sur l'ADN, mais ne se transloquent pas sur le chromosome. Ces résultats montrent que la taille des régions coiled-coil est cruciale pour l'activité des complexes SMC. Des analyses structurales permettent de comprendre l'importance conservée et fonctionnelle malgré la divergence des séquences (Bürmann et al. 2017).

Les gènes *smc-scpAB* sont présents dans la plupart des espèces bactériennes, alors que *mukBEF* n'est principalement retrouvé que chez les γ-protéobactéries. Seules les *Aeromonadales* possèdent à la fois *mukBEF* et *smc-scpAB* (Cobbe et Heck 2004; Yoshinaga et Inagaki 2021; Brézellec et al. 2006). *mksBEF* est lui toujours présent accompagné de *smc-scpAB* et exclusivement chez les genres bactériens *Pseudomonas* et les *Pseudoalteromonas* (communication personnelle d'Isabelle Vallet).

Il existe également des homologues associés à des éléments mobiles et composés de 4 gènes *mukBEFG* et *mksBEFG* ; mais leur implication dans des fonctions liées au chromosome n'est pas démontrée (tel que le complexe MksBEFG chez *C. glutamicum* (Böhm et al. 2020)) et leur homologie avec la condensine MksBEF discuté (communication personnelle I. Vallet).

1. Smc-ScpAB

Smc-ScpAB a une structure en forme d'anneau, qui est composé d'un dimère de Smc, d'une molécule de ScpA (kléisine) et d'un dimère de ScpB (« Kite »). Smc-scpAB est la condensine la plus répandue chez les bactéries et partage une homologie de séquence avec les SMCs eucaryotes **(Figure 2)** (Cobbe et Heck 2004; Yoshinaga et Inagaki 2021; Britton, Lin, et Grossman 1998; Soppa et al. 2002).

2. MksBEF

MksBEF présente une homologie de séquence avec MukBEF. MksBEF est caractérisé par sa région coiled-coil (superhélice) qui est la plus courte des condensines bactériennes. La condensine MksBEF est composée d'un dimère de MksB, d'une kléisine MksF et d'un dimère

de kites MksE **(Figure 2).** Chez *P. aeruginosa,* où elle a été particulièrement étudiée, MksBEF jouerait un rôle dans la virulence et l'infection, ce qui suggère un rôle de cette condensine bactérienne dans l'adaptation à l'environnement (Zhao et al. 2022).

3. MukBEF

MukBEF est composé d'un dimère de MukB, d'une kléisine MukF et un dimère de kites MukE (Niki et al. 1991; Yamanaka et al. 1996). Il a été observé par microscopie que 30% des complexes MukBEF chez *E. coli* adopte une structure sous forme de dimère de dimère, $MukB_4E_4F_2$ **(Figure 2)** (Badrinarayanan et al. 2012). Les gènes *mukBEF* font partie d'un groupe de gènes co-occurrents du gène *dam* codant la Dam méthyltransférase présent chez les ***γ***-protéobactéries parmi lesquels on retrouve également les gènes codant pour *matP* (Brézellec et al. 2006).

B. Le chromosome bactérien

Les bactéries ont en général un seul chromosome circulaire qui a une taille qui varie entre 580 kb chez *Mycoplasma genitalium* et 9200 kb chez *Myxococcus xanthus* (Casjens 1998). La réplication est bidirectionnelle, démarre au niveau de l'origine de réplication, progresse sur les deux bras chromosomiques et se termine dans une région appelée *ter*, proche du site *dif* de résolution des dimères de chromosome. Il existe des bactéries qui possèdent plusieurs chromosomes comme *Vibrio cholerae* (deux chromosomes), *Burkholderia cepacia* (trois chromosomes) alors que d'autres peuvent posséder des génomes linéaires (bactéries *Streptomyces* par exemple). La majeure partie du génome bactérien code des protéines fonctionnelles, la densité génétique est relativement uniforme, les gènes sont souvent groupés sous forme d'opérons et le répertoire génétique est influencé par le transfert horizontal des gènes (Rocha 2008).

Les bactéries ont la particularité de pouvoir assurer de façon concomitante plusieurs processus biologiques (Rocha 2008) tels que la réplication, la ségrégation, la transcription et la traduction. C'est pourquoi on retrouve chez certaines espèces comme *Bacillus subtilis* une co-orientation des gènes fortement exprimés et essentiels avec le sens de progression de la fourche de réplication, ainsi qu'une orientation des gènes essentiels sur le brin continu (leading strand). Cette distribution des gènes permet de diminuer l'impact des collisions réplication-transcription, et participe à la structuration du chromosome. Ces observations suggèrent une coévolution de la distribution génique et la structuration du chromosome (Rocha 2008; Postow et al. 2004; Worcel et Burgi 1972). En effet, les expériences des réarrangements

chromosomiques par inversions, transpositions, linéarisation et circularisation montrent une plus grande tolérance pour les réarrangements qui conservent l'orientation des séquences que pour les inversions. De plus, des analyses phylogénétiques suggèrent une conservation de l'organisation chromosomique probablement fonctionnelle (Rocha 2008; Esnault et al. 2007; Cui et al. 2007; Liu et al. 2006; Duigou et Boccard 2017).

En se basant sur des expériences de microscopie, il a été montré que le chromosome bactérien adopte souvent une disposition longitudinale dans la cellule. La disposition longitudinale est caractérisée par le positionnement de l'origine de réplication et du terminus au niveau des deux pôles de la cellule, tandis que les deux bras chromosomiques sont disposés sur l'axe longitudinal de la cellule. Cette disposition a été observée chez *Caulobacter crescentus* (Viollier et al. 2004), *Pseudomonas aeruginosa* (Vallet-Gely et Boccard 2013) *et Vibrio cholerae* (David et al. 2014). Pendant le processus de réplication, les deux origines se répartissent à chacun des deux pôles et le Ter se positionne au milieu de la cellule, lieu du futur septum de division (Viollier et al. 2004; Vallet-Gely et Boccard 2013; Bates et Kleckner 2005; David et al. 2014).

Chez d'autres bactéries comme *E. coli* existe une autre disposition chromosomique, appelée transversale. Cette disposition est caractérisée par le positionnement de l'origine de réplication et du terminus au milieu de de la cellule, tandis que les deux bras chromosomiques se positionnent dans les deux moitiés de la cellule (Wang et al. 2006; Nielsen et al. 2006; Bates et Kleckner 2005). Lors de la réplication dans des conditions de croissance lente, les deux origines se positionnent aux régions ¼ et ¾ de la cellule, et les bras chromosomiques (« Left » pour le bras gauche et « Right » pour le bras droit) se positionnent de la façon « Left-Ori-Right Left-Ori-Right » tandis que les régions *ter* restent localisées au septum de division, au milieu de la cellule, pour se repositionner avec les origines de réplication juste avant la division (Bates et Kleckner 2005; Nielsen et al. 2006; Wang et al. 2006) **(Figure 9 a-d)**.

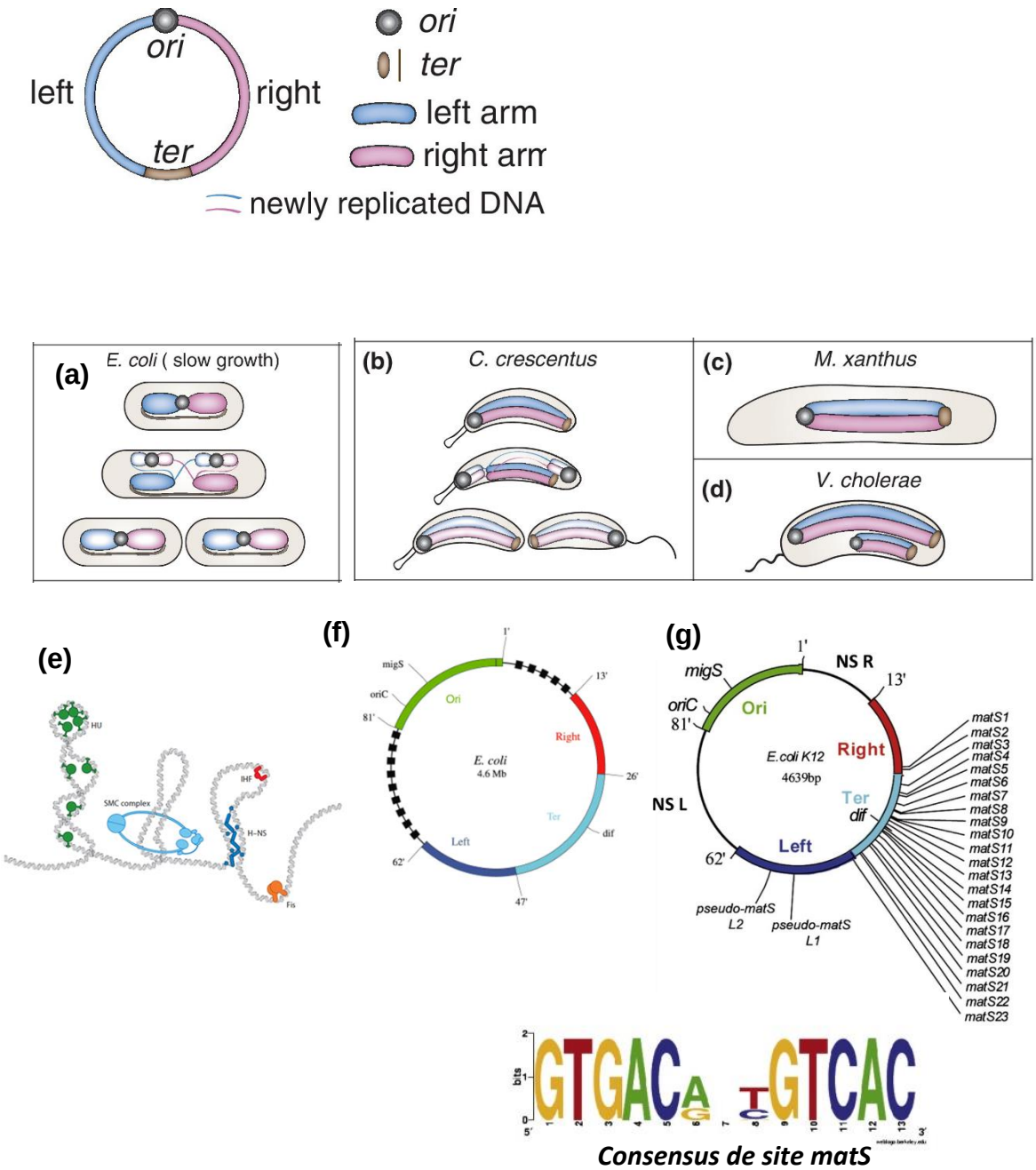


Figure 9 : Disposition et organisation du chromosome bactérien.

(a) Disposition transversale du chromosome d'*E. coli*

(b-d) Disposition longitudinale du chromosome de *C. crescentus*, *M. xanthus* et *V. cholerae* (Wang et Rudner 2014)

(e) Schéma représentatif de la structuration du chromosome par les NAPs (Badrinarayanan, Le, et Laub 2015).

(f) Schéma de l'organisation du chromsome d'*E.coli* en macrodomaine (Esnault et al. 2007).

(g)Schéma de la distribution des séquences *matS* (Mercier et al. 2008).

I. Structuration du chromosome bactérien

1. Structuration multi-échelle du chromosome bactérien

Chez les bactéries, le chromosome est fortement condensé dans une structure appelée nucléoïde (Kellenberger, Ryter, et Séchaud 1958), constitué d'ADN et de protéines comme les NAPs (Nucleoid Associated Proteins) (Skoko et al. 2006). Chez *E. coli*, des observations microscopiques ont montré que le nucléoïde occupe un volume qui dépend de la taille de la cellule (F. Wu, Swain, et al. 2019; J. K. Fisher et al. 2013). La structure dynamique du nucléoïde est la conséquence de l'activité des organisateurs structuraux protéiques du chromosome et des différents processus biologiques tels que la réplication et la transcription (J. K. Fisher et al. 2013; F. Wu, Japaridze, et al. 2019; F. Wu, Swain, et al. 2019; Lioy, Junier, et Boccard 2021; Rocha 2008). On peut observer également des variations de la structure globale du chromosome en fonction de l'étape de croissance, de l'état physiologique des cellules (végétatif/sporulation) et du mode vie (symbiose, infection) (Lioy, Junier, et Boccard 2021; Marbouty et al. 2015; Le et al. 2013; Lioy et al. 2018; Ren et al. 2022; Lioy et al. 2021).

Plusieurs niveaux d'organisation du chromosome bactérien ont été mis en évidence. Le surenroulement de l'ADN participe à une structuration locale, contrôlée principalement par les topoisomérases qui génèrent des domaines topologiques d'une dizaine de kb (10-100 kb) (Postow et al. 2004). Un deuxième niveau de structuration, composant la chromatine bactérienne, est assuré par les NAPs, qui sont des protéines qui possèdent des domaines d'interaction à l'ADN. Chez *E. coli*, les NAPs comme Fis, H-NS, IHF, HU et StpA imposent des courbures, des torsions, voire des pontages à la molécule d'ADN jouant ainsi un rôle majeur dans la condensation ainsi que dans la régulation de la transcription et de la réplication (Lioy et al. 2018).

A un niveau supérieur, les techniques de 3C-seq et HiC montrent l'existence d'un type de structure appelé CID (*Chromosomal Interaction Domains*), qui sont des domaines de 30 à 400 kb. Les CIDs sur une matrice de contacts HiC correspondent à des régions à l'intérieur desquelles les loci ont une plus grande probabilité d'interaction qu'avec les loci des domaines adjacents. Ces régions sont souvent délimitées par des groupes de longs gènes (>2 kb) fortement exprimés. L'étude des CIDs permet de révéler un lien entre la transcription et la structuration du chromosome chez les bactéries (Lioy, Junier, et Boccard 2021; Rocha 2008; Marbouty et al. 2015; Le et al. 2013; Lioy et al. 2018; Postow et al. 2004; Worcel et Burgi 1972; Ren et al. 2022; Mercier et al. 2008). Chez *C. crescentus*, 23 CIDs ont été détectés et l'inhibition de la

transcription ou le déplacement de gènes fortement exprimés modifient la distribution des CIDs sur le chromosome (Le et Laub 2016).

Finalement, en se basant sur les propriétés d'interaction génétique et de mobilité des loci chromosomiques (par des approches de microscopie FISH), un niveau d'organisation chromosomique de l'ordre du mégabase a été décrit chez *E. coli*. Ces structures appelées « macrodomaine » (MD) résultent de la capacité d'interactions de loci du chromosome à interagir au sein d'un même macrodomaine mais pas entre macrodomaines voisins. Quatre MD d'environ 1 Mb ont été identifiés : Ori, Ter, Right et Left, et deux régions non structurées (Valens et al. 2004; Espeli, Mercier, et Boccard 2008) **(Figure 9 f et g)**. Les déterminants moléculaires de la structuration en MD ont été identifiés et reposent sur le système de structuration MatP/*matS* pour le MD Ter, la distance par rapport à *OriC* pour les MD Right et Left (Valens et al. 2004; Espeli, Mercier, et Boccard 2008; Thiel et al. 2012) et sur le système MaoP/*maoS* pour le MD Ori (Valens, Thiel, et Boccard 2016) **(Figure 9 g)**.

2. Le système MatP/matS et le macrodomaine Ter

Le gène matP fait partie d'un groupe de gènes co-occurrents du gène *dam* codant la Dam méthyltransférase présent chez les γ-protéobactéries, parmi lesquelles on retrouve également les gènes codant la condensine bactérienne *mukBEF*, mais également le gène *zapB* codant la protéine de division ZapB avec laquelle MatP interagit ou encore le gène *maoP* impliqué dans la structuration de la région Ori (Brézellec et al. 2006; Espéli et al. 2012).

MatP est une protéine de 150 acides aminés et de 17.693 Da, qui se fixe spécifiquement sur *28 sites matS* distribués sur les 800 kb du MD Ter. Le nombre et la densité des *sites matS* varient selon les espèces (Mercier et al. 2008). Une analyse fonctionnelle et la résolution de la structure de la protéine MatP de *Yersina pestis* ont mis en évidence que MatP est constitué de 3 domaines, un domaine N-terminal de liaison à l'ADN appelé *"four-helix bundle*", un domaine central de dimérisation appelé RHH pour *"Ribbon-Helix-Helix"* et un domaine C-terminal d'interaction protéine-protéine. MatP se fixe sur les *sites matS* sous forme de dimère grâce à son domaine de dimérisation. Il a été montré *in vivo* par des expériences de double hybride chez *E. coli* que MatP interagit avec ZapB *via* son domaine C-terminal. De plus, des approches de microscopie et d'analyse de molécules uniques ont montré que ce domaine C-terminal permet, *in vitro*, la tétramérisation de MatP et la formation d'un pontage entre deux sites *matS* ou entre un site *matS* et de l'ADN non spécifique. (Mercier et al. 2008; Thiel et al. 2012; Crozat et al. 2020; Espéli et

al. 2012). Cette hypothèse de tétramérisation de MatP n'a pour l'instant pas pu être confirmée *in vivo*.

Les *sites matS* (*MAcrodomain Ter sequence*) ont été détectés par des analyses bioinformatiques comme un motif de 13 nucléotides, spécifique du MD Ter. La protéine MatP (*macrodomain Ter protein*) a ensuite été identifiée par un crible génétique basé sur la liaison de facteurs aux sites *matS*. Les expériences d'affinité (mesurées par expériences de retard sur gel et de calorimétrie) ont permis de montrer *in vitro* que l'affinité de MatP pour les séquences *matS* était proche de 8 nM. Enfin, une expérience de « ChIP on Chips » a confirmé la fixation des *sites matS* par MatP *in vivo* (Mercier et al. 2008).

Les techniques de microscopie PALM (Photoactivated localization microscopy) et d'épifluorescence ont montré que MatP participe au positionnement de la région Ter au septum de division, grâce à son interaction avec ZapB. En effet l'interaction de MatP avec le septum de division permet de stabiliser le complexe ZapB-ZapA-FtsZ, et d'éviter la division précoce (Buss et al. 2017; Bailey et al. 2014). De plus, un plasmide portant des sites *matS* se positionne au niveau du site de division et colocalise avec le Ter, en présence de ZapB et des 20 derniers AA de MatP (Lioy et al. 2018; Espéli et al. 2012). Ces résultats montrent chez *E. coli* l'existence d'un ancrage des séquences possédant des sites *matS* au septum de division. Chez *E. coli*, l'absence de MatP n'affecte pas le positionnement du septum de division en raison de la présence d'autres systèmes qui le positionnent ; cependant le temps de fermeture du septum de division est raccourci et la chorégraphie du MD Ter est modifiée **(Figure 10)**.

Après la réplication du MD Ter, MatP maintient les deux Ter colocalisés au septum de division durant une partie importante du cycle cellulaire ; les deux régions Ter dupliquées se séparent ensuite, peu de temps avant la division cellulaire. Il est à noter que les deux Ter se colocalisent, mais qu'ils ne sont pas assez proches pour être cohésifs, au sens où l'on ne détecte pas d'interactions physiques au niveau moléculaire (Mercier et al. 2008; Espéli et al. 2012; Lesterlin et al. 2012). En l'absence de *matP*, les deux Ter se séparent rapidement et se relocalisent aux régions ¼ et ¾ de la cellule (Mercier et al. 2008; Espéli et al. 2012) **(Figure 10)**.

Chez les bactéries qui ont plusieurs chromosomes tel que *V. cholerae*, le rôle de MatP diffère entre le chromosome I et II malgré la présence des *sites matS* sur les deux replichores. La densité de *sites matS* chez *V. cholerae* est similaire à celle d'*E. coli*. Des expériences de microscopie ont montré que le Ter du chromosome I est positionné au niveau du septum de division. Cependant en absence de *matP*, les régions Ter du chromosome 1 restent à proximité du milieu

de la cellule. A l'inverse, les régions Ter des chromosomes 2 se positionnent ensemble au milieu de la cellule grâce à MatP, puis se séparent de chaque côté du divisome avant le début de la septation. En conséquence, la délétion de *matP* affecte la chorégraphie du chromosome II de *V. cholerae* de façon comparable à celle du chromosome d'*E. coli* (Espéli et al. 2012; Demarre et al. 2014).

Il a été montré *in vitro* par des expériences sur molécules uniques que MatP est capable par tétramérisation de former un pont entre deux molécules d'ADN, cependant ce pontage s'effectue aussi bien entre deux sites *matS*, qu'avec un site *matS* et de l'ADN non spécifique (Crozat et al. 2020). Chez *Plesiomonas shigelloide*, une entérobactérie possédant deux chromosomes, il a été montré par alignement des séquences d'acides aminés que les protéines MatP de *P. shigelloide* et de *V. cholerae* partagent un motif (signature) dans leurs domaines de dimérisation RHH, signature absente chez les autres entérobactéries qui ont un seul chromosome. Cette observation suggère une adaptation fonctionnelle de MatP dans un contexte de bactéries à deux chromosomes (Adam et al. 2022).

Le système MatP/*matS* joue un rôle essentiel dans la conformation du MD Ter, en restreignant dans un test génétique la capacité des loci à faire des contacts lointains (plus de 300 kb) (Valens, Thiel, et Boccard 2016; Thiel et al. 2012; Adam et al. 2022). Les études réalisées au laboratoire ont montré que cette contrainte est due à l'inhibition de l'activité de la condensine MukBEF. Les détails sur ce rôle du système MatP/*matS* sont détaillés dans la partie qui concerne la condensine bactérienne MukBEF.

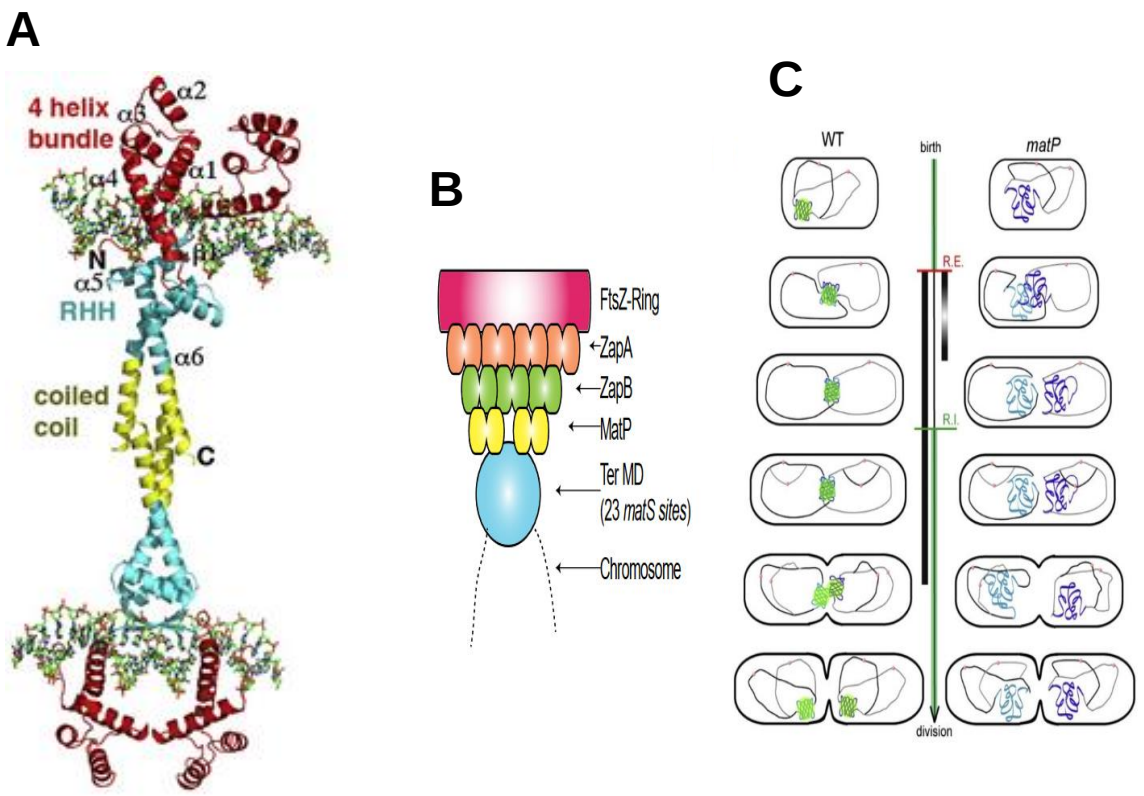


Figure 10 : MatP ancre le macrodomaine Ter au septum de division.
(A) Structure d'un tétramère MatP de *Yersinia pestis* fixé sur l'ADN obtenu par cristallographie (Dupaigne et al. 2012).
(B) Schema de l'interaction du Ter au divisome.
(C) Model illustratif de la co-localisation du MD Ter et du septum de division au cours du cycle cellulaire dans des condition sauvages et *DmatP* (Mercier et al. 2008).

Table 1. Phenotypes associated with mutation in genes of bacterial SMC complexes

	Deletions	T.S.	Anucleate cells	Disorg.	Decond.	Gyrase inh.	Cell morphology	References
Alpha-proteobacteria								
C. crescentus SMC-ScpAB	Δ*smc*	Yes	0.1% in p. and n.p.	10–15%	Yes	n.d.	Cell cycle arrest at predivisional stage	Jensen & Shapiro (1999, 2003) and Schwartz & Shapiro (2011)
Gamma-proteobacteria								
E. coli MukBEF	Δ*mukB*	Yes	10–20% in n.p., 5% in p.	Yes	Yes	Yes	Filament	Niki *et al.* (1991), Yamanaka *et al.* (1996), Sawitzke & Austin (2000) and Danilova *et al.* (2007)
P. aeruginosa SMC-ScpAB	Δ*smc*	No	2.5%	n.d.	n.d.	n.d.	WT	Petrushenko *et al.* (2011)
P. aeruginosa MksBEF	Δ*mksB*	No	1.2% only in M9 at 37 °C	n.d.	n.d.	n.d.	WT	Petrushenko *et al.* (2011)
Firmicutes								
B. subtilis SMC-ScpAB	Δ*smc*	Yes	10% in p., >10% in n.p.	Yes	Yes	Yes	Elongated cells	Britton *et al.* (1998), Moriya *et al.* (1998) and Lindow *et al.* (2002)
B. subtilis SMC-ScpAB	Δ*smc*Δ*spo0J*	Yes	26% in p.	Yes	Yes	n.d.	Elongated cells	Britton *et al.* (1998)
S. pneumoniae SMC-ScpAB	Δ*smc*	No	0.5% at 30 °C, 1.8% at 37 °C	n.d.	No	No	WT	Minnen *et al.* (2011)
S. aureus SMC-ScpAB	Δ*smc*	No	10% at 30 °C, 8% at 37 °C and 2.5% at 42 °C	n.d.	No	n.d.	WT	Yu *et al.* (2010)
S. aureus SMC-ScpAB	Δ*smc*Δ*spoIIIE*	Yes	4% in p., 6% in n.p.	Yes	n.d.	n.d.	Heterogeneous	Yu *et al.* (2010)
Actinobacteria								
S. coelicolor SMC-ScpAB	Δ*smc*	No	7%	n.d.	Yes	n.d.	WT	Dedrick *et al.* (2009) and Kois *et al.* (2009)
S. coelicolor SMC-ScpAB	Δ*smc*Δ*parB*	No	23%	n.d.	n.d.	n.d.	Spore compartments with altered shape and size	Dedrick *et al.* (2009), Kois *et al.* (2009)
M. smegmatis SMC-ScpAB	Δ*smc*	No	n.d.	n.d.	n.d.	No	n.d.	Güthlein *et al.* (2008)
M. tuberculosis SMC-ScpAB	Δ*smc*	No	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	Güthlein *et al.* (2008)
Deinococcus-thermus								
D. radiodurans SMC-ScpB	Δ*smc*	No	No	No	No	Yes	WT	Bouthier de la Tour *et al.* (2009)
Archaea euryarchaeot								
M. voltae SMC-ScpAB	*smc::pac*	No	20%	n.d.	No	n.d.	1–2% titan cells	Long & Faguy (2004)

Anucleate cells: percentage of anucleate cells (or spores in the case of *S. coelicolor*) in the conditions indicated.
T.S., temperature-sensitive growth; Disorg, altered nucleoid organization; Decond, decondensation of the nucleoid; Gyrase inh, hypersensitivity to gyrase inhibitor; Cell morphology, after a switch to nonpermissive growth conditions when applicable; p, permissive growth conditions; n.p, after a switch to nonpermissive growth; onditions; n.d, not determined; WT, wild type.

Tableau 1 : Phénotypes des délétions des smc bactérien. (Nolivos et Sherratt 2014).

II. La ségrégation des chromosomes chez les bactéries

La ségrégation du chromosome bactérien est concomitante avec la réplication ; de ce fait, la ségrégation se fait progressivement, d'abord dans les régions Ori, puis sur le reste du chromosome d'une façon séquentielle. Néanmoins, la progression de la ségrégation n'est pas linéaire et les régions terminales présentent souvent un délai de ségrégation (Kawalek et al. 2020; Vallet-Gely et Boccard 2013; Bates et Kleckner 2005; Espinosa, Barre, et Galli 2017). Cette ségrégation tardive du *ter* est chez certaines bactéries due à une interaction de la région Ter au niveau du septum de division (Deghorain et al. 2011; Stouf, Meile, et Cornet 2013). Une hypothèse non démontrée au niveau moléculaire propose également que la ségrégation des régions *ter* répliquées nécessite l'élimination des caténanes par la Topoisomérase IV avant de pouvoir s'effectuer (Conin et al. 2022).

Chez les bactéries, deux systèmes ont principalement été impliqués dans la ségrégation chromosomique : le système ParABS et les condensines bactériennes. Le rôle des condensines dans la ségrégation chromosomique est affecté par la présence du système de partition *parABS* **(Tableau 1)**. On peut observer pour la ségrégation des chromosomes un partenariat variable entre les condensines bactériennes et le système ParABS. Ainsi chez certaines bactéries telles que *Caulobacter crescentus* et *Pseudomonas aeurginosa,* la délétion de la condensine bactérienne n'a pas ou peu d'effet sur la ségrégation qui est assuré principalement par ParABS. A l'inverse chez *B. subtilis*, l'absence de la condensine a un effet majeur sur la ségrégation; le système ParABS quand il est présent est dédié à la sporulation (Britton, Lin, et Grossman 1998; L. J. Wu et Errington 2003). Chez *V. cholerae,* si la ségrégation du chromosome II nécessite la présence de ParAB II, le chromosome I peut assurer sa ségrégation de façon équivalente en l'absence de ParAB I ou de MukBEF, mais la présence d'un de ces deux acteurs est requis (Kawalek et al. 2020).

1. Le système ParABS

Il a été montré dans une étude bioinformatique sur 400 espèces représentatives du monde bactérien, qu'environ 69% des bactéries contiennent le système *parABS*. Le système de partition *parABS* est constitué d'une séquence de type centromère et de deux protéines. Les analyses génétiques ont montré que les bactéries qui ont plusieurs chromosomes possèdent un système ParABS spécifique pour chaque chromosome comme chez *V. cholerae*. Les bactéries dépourvues de système parABS se retrouvent dans quelques branches de l'arbre phylogénétique

des bactéries, suggérant que le système parABS est apparu très tôt dans l'histoire évolutive des bactéries (Livny, Yamaichi, et Waldor 2007) ; les gènes *par* sont absents dans deux familles bactériennes, chez les γ-proteobacteria comme *E. coli*, et chez les Mollicutes comme *Mycoplasma sp* (Kawalek et al. 2020) **(Tableau 1)**.

Le système de partition chromosomique ParABS est constitué d'une ou plusieurs séquences appelées *parS* (partition S) qui se situent à proximité de l'origine de réplication et reconnue par la protéine ParB. ParB (PARtition protein B) est une protéine CTPase, qui a un domaine d'interaction avec l'ADN et un domaine de dimérisation. ParB complexé au CTP reconnaît spécifiquement et transitoirement les sites *parS* et se charge sur l'ADN en formant un anneau. Le site *parS* stimule l'activité CTPase de ParB, ce qui diminue l'affinité de ParB au site *parS* et induit son oligomérisation sur une région d'environ 15 kb (Livny, Yamaichi, et Waldor 2007; Osorio-Valeriano et al. 2021; Tišma et al. 2022). ParA est une ATPase, qui interagit avec ParB et avec l'ADN de manière aspécifique. L'interaction ParA/ParB-*ParS* stimule l'activité ATPase de ParA, la dissociant de l'ADN et induisant un déplacement des séquences liées à ParB. Le mécanisme moléculaire de la ségrégation n'est pas encore clairement établi. Plusieurs modèles ont été proposés ; on distingue les modèles « *Pulling* », « *Diffusion-ratchet* », et «*nucleation and caging*» (Jalal et Le 2020; Ptacin et al. 2010; Vecchiarelli, Mizuuchi, et Funnell 2012). Ils décrivent la relocalisation de la région Ori suite à l'interaction ParA/ParB.

Le système ParABS est essentiel chez certaines bactéries telles que *Caulobacter crescentus* (α-proteobacteria), *Myxococcus xanthus* (δ-proteobacteria), et pour la ségrégation du chromosome 2 de *V. cholerae* (γ-proteobacteria). Par contre, chez d'autres espèces, les phénotypes d'inactivation du système ParABS diffèrent selon les conditions de croissances (rapide ou lente) ; on peut retrouver des phénotypes très sévères comme la présence de cellules anucléées, filamenteuses ou même la mort cellulaire. Il est à noter que chez certaines bactéries, le système ParABS intervient dans la sporulation et son rôle dans la ségrégation en croissance végétative est négligeable ; ainsi on retrouve en absence de *parB* un phénotype de spores anucléées chez *Streptomyces coelicolor* (Kawalek et al. 2020). Chez *B. subtilis*, les expériences de génétique ont montré que le déplacement des sites *parS*, ou la délétion de *spo0J* (*parB*), affecte la ségrégation dans des conditions de croissance rapide tandis que la délétion de *SoJ* (*parA*) n'a pas d'effet. Les expériences ont montré que ParB/*parS* joue un rôle dans la ségrégation indépendamment de ParA, et cela a été confirmé par la génération de mutants de ParB inefficaces pour la sporulation (mesuré par le taux des spores viables), et efficace pour la ségrégation (taux de cellules anucléées) (Gruber et Errington 2009).

2. La ségrégation par les condensines bactériennes

Le mécanisme moléculaire de la ségrégation par les condensines n'est pas encore compris et différents modèles ont été proposés suite à différents types de simulation (Murray et Sourjik 2017; Hofmann et al. 2019).

a. Smc-ScpAB

Chez les bactéries où Smc-ScpAB est requis pour la ségrégation du chromosome, la délétion de *smc* induit différents phénotypes de croissance ou de physiologie cellulaire, selon les contextes et espèces. On retrouve principalement des phénotypes tels que l'apparition de cellules anucléées, la thermo-sensibilité, la sensibilité aux inhibiteurs de gyrase, le changement de la morphologie cellulaire (*Bacillus subtilis, Staphylococcus aureus, Streptomyces coelicolor*) **(Tableau 1)**. La façon dont Smc-ScpAB interagit avec le chromosome en l'absence du complexe ParB-*parS* n'a pas été caractérisée.

b. MksBEF

Les seules études exhaustives de l'implication de MksBEF dans la ségrégation des chromosomes bactériens ont été réalisées chez la bactérie *Pseudomonas aeroginosa.* Cette bactérie, en plus de posséder un système ParABS, possède deux condensines : Smc-ScpAB et MksBEF. La délétion de ces deux condensines n'a pas d'effets directement mesurables sur la production de cellules anucléées en présence de ParABS. Néanmoins en l'absence du système de partition, MksBEF assure la ségrégation correcte du chromosome avec moins de 3% de cellules anucléées dans un mutant *ΔparS*, alors que le double mutant *ΔparS ΔmksBEF* produit 25% de cellules anucléés. La délétion de *smc* quant à elle a un effet négligeable. Ces résultats montrent que le système ParABS assure la ségrégation efficace du chromosome et en l'absence de ce dernier, MksBEF est capable de le suppléer (Lioy et al. 2020) **(Figure 11)**.

L'étude d'étiquettes fluorescentes insérées à différentes positions du chromosome a également mis en évidence que les loci proche de l'origine présentent un fort retard de ségrégation dans un mutant *parS* alors que la délétion de *mksBEF* a peu d'effet. A l'inverse, la ségrégation des loci dans les régions intermédiaires ou dans la partie terminale du chromosome est fortement impactée par la délétion de *mksBEF* mais pas par celle de *parS*. Ces résultats suggèrent que les deux systèmes de ségrégation de *P. aeruginosa* pourraient agir séquentiellement sur deux zones

distinctes du chromosome : le système ParABS pour la région Ori et MksBEF pour la partie terminale du chromosome (Lioy et al. 2020).

c. MukBEF

Chez *E. coli*, les gènes *mukBEF* sont organisés en opéron avec un gène non essentiel *stmA* codant une méthyle transférase. Il a été montré que la délétion d'un des gènes *mukF*, *mukE* ou *mukB* induit un phénotype *muk-;* l'inactivation de MukBEF se traduit par une thermosensibilité, une sensibilité au milieu riche et la formation de cellules anucléées (Niki et al. 1991; Lioy et al. 2018; Yamanaka et al. 1994). A la température permissive de 22°C et en milieu minimum, le mutant *muk* génère environ 25% environ de cellules anucléés (Niki et al. 1991; Lioy et al. 2018; Yamanaka et al. 1994). Plusieurs évidences suggèrent que le contrôle du surenroulement de l'ADN joue un rôle important pour la survie des mutants *muk*-. En effet, les mutants *muk*- sont hypersensibles à la novobiocine (inhibiteur de l'ADN gyrase) et la mutation *topA10* (mutation dans la topoisomérase I) ou la surexpression de la gyrase suppriment la thermosensibilité du mutant *muk*-. Il a été proposé que l'augmentation du surenroulement négatif (par la diminution de l'activité de TopA, ou l'augmentation de l'activité de l'ADN gyrase) faciliterait la ségrégation des chromosomes dans un contexte *muk*- (Sawitzke et Austin 2000; Weitao, Nordström, et Dasgupta 1999); néanmoins, à ce jour, aucune démonstration moléculaire n'a permis d'expliquer ces phénotypes **(Figure 12 A et B)**.

Chez *E. coli*, après réplication et ségrégation, les chromosomes ont une disposition transversale et les bras des chromosomes sont orientés majoritairement de la façon Left-ori-Right Left-ori-Right. Dans un contexte *muk*-, cette disposition est perturbée, les deux bras d'un même chromosome pouvant partager la même moitié cellulaire (Lioy et al. 2018) **(Figure 12 C)**.

Chez *V. cholerae*, on retrouve la condensine MukBEF en plus de deux systèmes de partition ParABS spécifiques de chacun des deux chromosomes. Le mutant *muk*- ne présente pas de phénotype particulier et les travaux sur les systèmes de partitions *parABS* montrent que le système *parABS I* n'est pas essentiel et n'a que peu d'effet sur la ségrégation du chromosome I alors que *parABS II* est essentiel. Néanmoins des expériences réalisées dans le laboratoire de F.X. Barre montrent que le double mutant *ΔparABSI muk*- présente un fort phénotype de retard de croissance (communication personnelle de C. Possoz) suggérant que *mukBEF* et *parABS I* assurent conjointement la ségrégation du chromosome I.

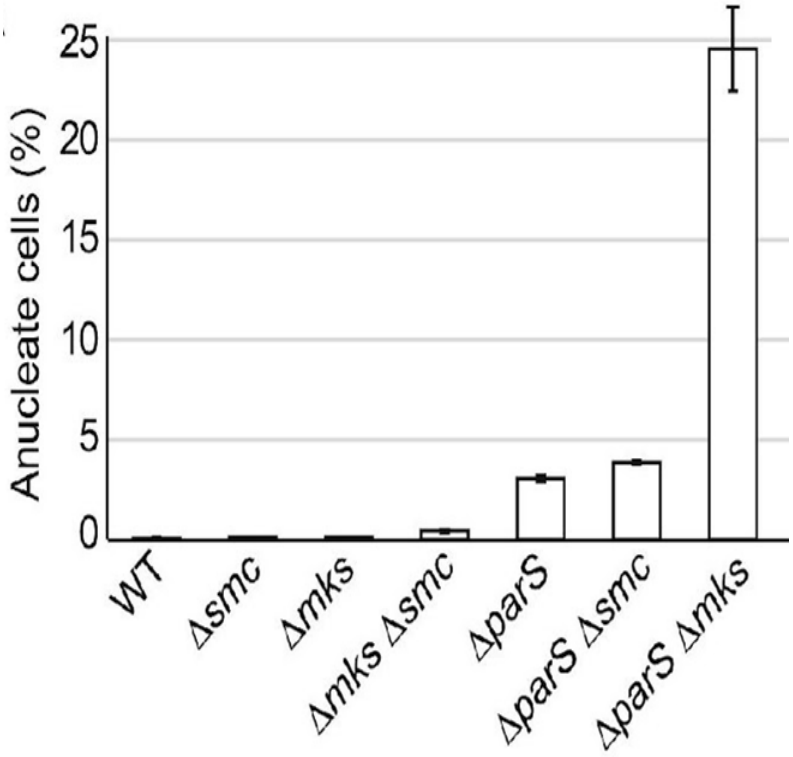


Figure 11 : La ségrégation du chromosome chez *Pseudomonas aeruginosa.*
Le pourcentage de cellules anucléées chez des mutants cultivés en milieu minimum avec citrate à 30°C est représenté sur l'histogramme, avec la moyenne et l'écart-type calculés à partir de trois expériences indépendantes (Lioy et al. 2020).

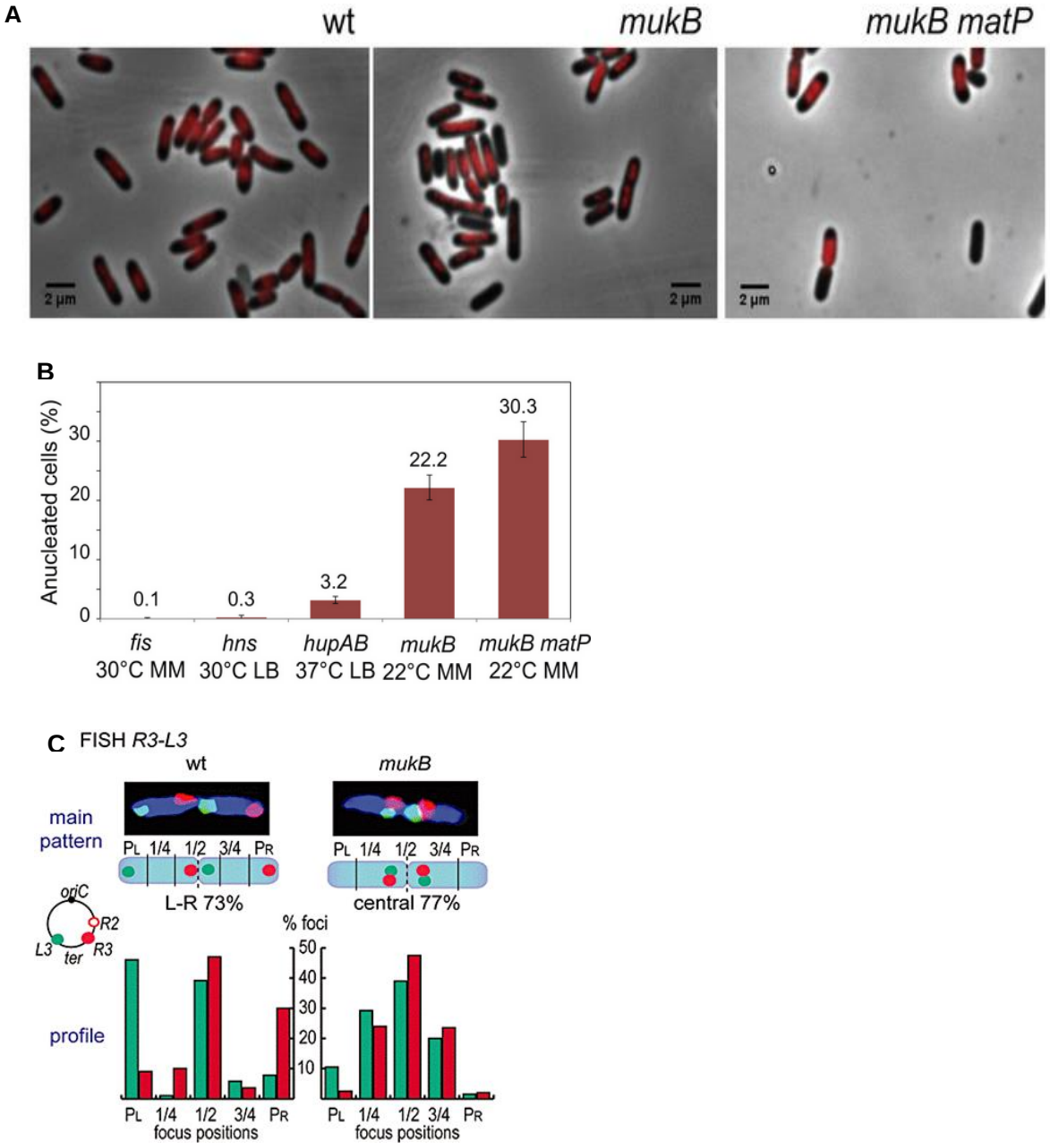


Figure 12 : Ségrégation du chromosome d'*E.coli* par MukBEF

(A) Cellules représentatives d'*E.coli*, nucléoïde marqué par DAPI en rouge en WT, *ΔmukB* et *ΔmukB ΔmatP*. Les cellules noires sont des cellules anucléées

(B) **C**omptage des cellules anucléées dans différents contextes génétiques et différents conditions de croissance (adaptées de (Lioy et al. 2018))

Représentation du positionnement des bras du chromosome R3 à droite et L3 à gauche, par FISH :

En haut, des cellules représentatives du positionnement des bras de chromosomes

En bas, la quantification du positionnement des bras du chromosome.

Figure adaptée à partir de la référence (Danilova et al. 2007).

III. Le rôle des condensines bactériennes dans la conformation du chromosome

1. SMC-ScpAB

a. Chargement de Smc-ScpAB

Des expériences de ChIP-seq chez *B. subtilis* ont montré un enrichissement de SMC au niveau des sites *parS*, enrichissement perdu dans un mutant *parB*. Ces résultats suggèrent que Smc-ScpAB est chargé par ParB au niveau du site *parS* (Sullivan, Marquis, et Rudner 2009; Gruber et Errington 2009). Le chargement de Smc-ScpAB au niveau de site *parS* par ParB a été également observé chez *Streptococcus pneumoniae* (Minnen et al. 2011), *P. aeruginosa* (Lioy et al. 2020), et *C. crescentus* (Tran, Laub, et Le 2017). Les techniques de capture de conformation utilisées chez les bactéries à partir de 2013 ont permis de montrer que ce chargement en un point spécifique du chromosome impacte l'ensemble de l'organisation du chromosome. Le chargement de Smc-ScpAB au niveau des sites *parS* se traduit par la formation d'une seconde diagonale sur les matrices de contacts, diagonale dont l'origine suit la position des sites *parS* quand ceux-ci sont déplacés. Chez *B. subtilis*, *C. crescentus* ou *P. aeruginosa*, Smc-ScpAB est donc préférentiellement chargé sur le chromosome par ParB et induit une conformation particulière (Yano, Noguchi, et Niki 2022; Murray et Sourjik 2017; Bock et al. 2022; Nunez, Avila, et Gruber 2019; Minnen et al. 2016; Nunez et al. 2021) **(Figure 13 c)**.

Chez *B. subtilis*, un modèle qui explique le chargement de Smc-ScpAB sur les sites *parS* a été proposé en se basant sur une combinaison de différentes approches (Bock et al. 2022; Nunez, Avila, et Gruber 2019; Minnen et al. 2016; Nunez et al. 2021). Le complexe Smc-ScpAB pour se charger sur le chromosome fixe l'ATP, adopte une conformation avec les bras (coiled-coil) dans une position ouverte tout en formant une structure en anneau fermé (Nunez, Avila, et Gruber 2019; Nunez et al. 2021). L'hydrolyse d'ATP n'est pas nécessaire pour le chargement. La protéine ParB forme un dimère qui entoure un site *parS*, en fixant deux molécules de CTP et, en courbant la molécule d'ADN, interagit avec Smc-ScpAB au niveau de la région « Joint ». L'interaction du joint de Smc avec la région N-terminale de ParB permet au complexe Smc-ScpAB de se charger sur l'ADN et d'amorcer la formation d'une boucle (Bock et al. 2022). Il est à noter que l'activité CTPase de ParB n'est pas non plus requise pour le chargement de Smc-ScpAB (Tišma et al. 2022). Cependant, les mutants ParB qui ne s'oligomérisent pas ne parviennent pas à charger Smc-ScpAB sur l'ADN (tels que ParB R79A chez *B.subtilis* (Wang et al. 2015) ou ParB R175A (mutant d'interaction entre dimères) chez *C. glutamicum* (Böhm

et al. 2020)). A partir de ce point de chargement, Smc-ScpAB se transloque et aligne les deux bras du chromosome, ce qui se traduit par la formation d'une deuxième diagonale sur la matrice de contacts HiC (Marbouty et al. 2015; Wang et al. 2015; 2014). Des expériences de HiC ont montré que l'absence de ParB a un impact fort sur la conformation du chromosome et que la seconde diagonale n'est plus présente (Wang et al. 2015; 2017). Cela a été également observé chez d'autres bactéries tels que *C. glutamicum* (Böhm et al. 2020), *P. aeruginosa* (Lioy et al. 2020) et *C. crescentus* (Tran, Laub, et Le 2017). Néanmoins si l'absence de ce chargeur a un impact fort sur la conformation, il induit, chez *B. subtilis*, un défaut de ségrégation faible (<1%); ces résultats suggèrent qu'il y a suffisamment de Smc-ScpAB chargé sur le chromosome pour assurer la ségrégation du chromosome en absence du mécanisme de chargement impliquant le couple ParB-*parS*. Cette hypothèse est renforcée par l'observation de ChIP-seq qui révèle, en absence de ParB, un signal de SMC sur le chromosome mais pas d'enrichissement spécifique près des sites *parS* (Wang et al. 2014; 2015; 2017). L'étude de la conformation du chromosome permet donc de mettre en lumière l'activité de Smc-ScpAB et notamment sa capacité à former une large boucle d'ADN formant une seconde diagonale. Néanmoins il faut garder à l'esprit que chez *B. subtilis*, cette activité n'est pas essentielle à la ségrégation et qu'en l'absence de cette seconde diagonale, Smc-ScpAB interagit avec l'ADN et ségrége efficacement les chromosomes.

b. Activité et translocation de Smc-ScpAB

Chez *B. subtilis*, Smc-ScpAB progresse à partir des séquences *parS* en alignant les deux bras du chromosome (Wang et al. 2015; 2017). Les expériences de cinétique de ChIP-seq ciblant Smc-ScpAB et les expériences de HiC ont montré une corrélation entre l'enrichissement de Smc-ScpAB et la progression de son activité d'alignement des bras du chromosome sur les matrices de contacts (Wang et al. 2015; 2017). Ces analyses ont permis d'estimer sa vitesse de translocation : Smc-ScpAB progresse sur les deux bras du chromosome à une vitesse de 52±5 kb/min, dans la direction Ori-Ter. Cette translocation requiert l'activité ATPase de Smc-ScpAB et des mutants possédant une activité ATPase réduite présente un retard de 4 à 10 min pour aligner les deux bras, ainsi qu'une vitesse réduite de 18% à 40% (Wang et al. 2015; 2017; 2018) **(Figure 13 et 14)**.

Dans un autre contexte, Smc-ScpAB de *C. crescentus* aligne les bras du chromosome à une vitesse similaire d'environ 19kb/min, dans la direction Ori-Ter. De la même façon, l'enrichissement de Smc-ScpAB dépend de la position du site *parS* et corrèle avec la zone alignée du chromosome (Tran, Laub, et Le 2017).

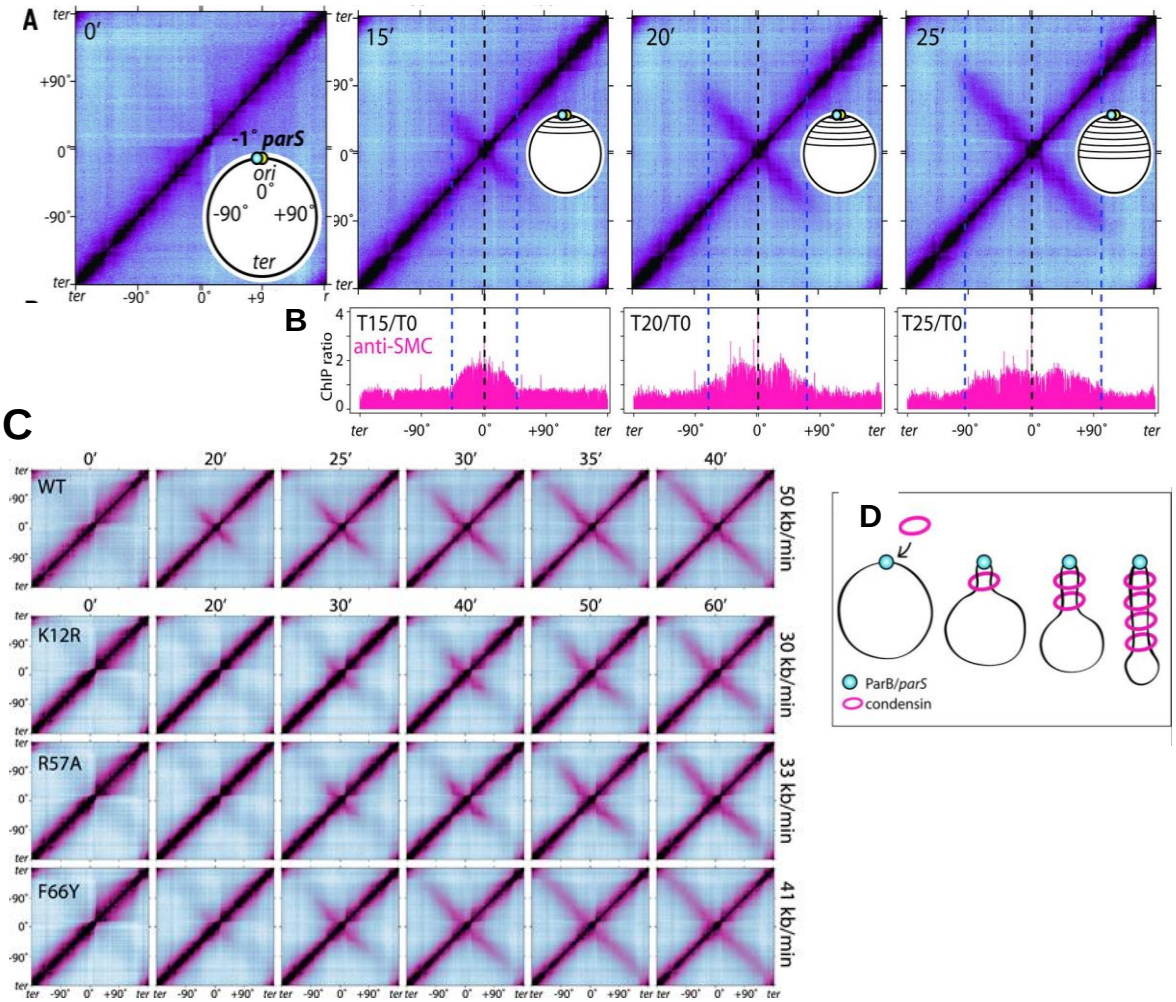


Figure 13 : Translocation de Smc-ScpAB sur le chromosome de *B. subtilis*.

A) Matrices HiC normalisées à 10 Kb-bin, issues d'une expérience de cinétique de l'activité de Smc-ScpAB, après induction de l'expression de ParB, sur une souche qui contient un seul site ParS -1°.

B) Profils ChIP-seq de Smc dans les mêmes conditions qu'en (A)

C) La même cinétique que réalisé en (A) mais avec plus de points et différents mutant de l'activité ATPase de Smc.

D) Schéma représentatif du chargement et de la translocation de Smc-ScpAB

Figures adoptées de (Wang et al. 2017; 2018).

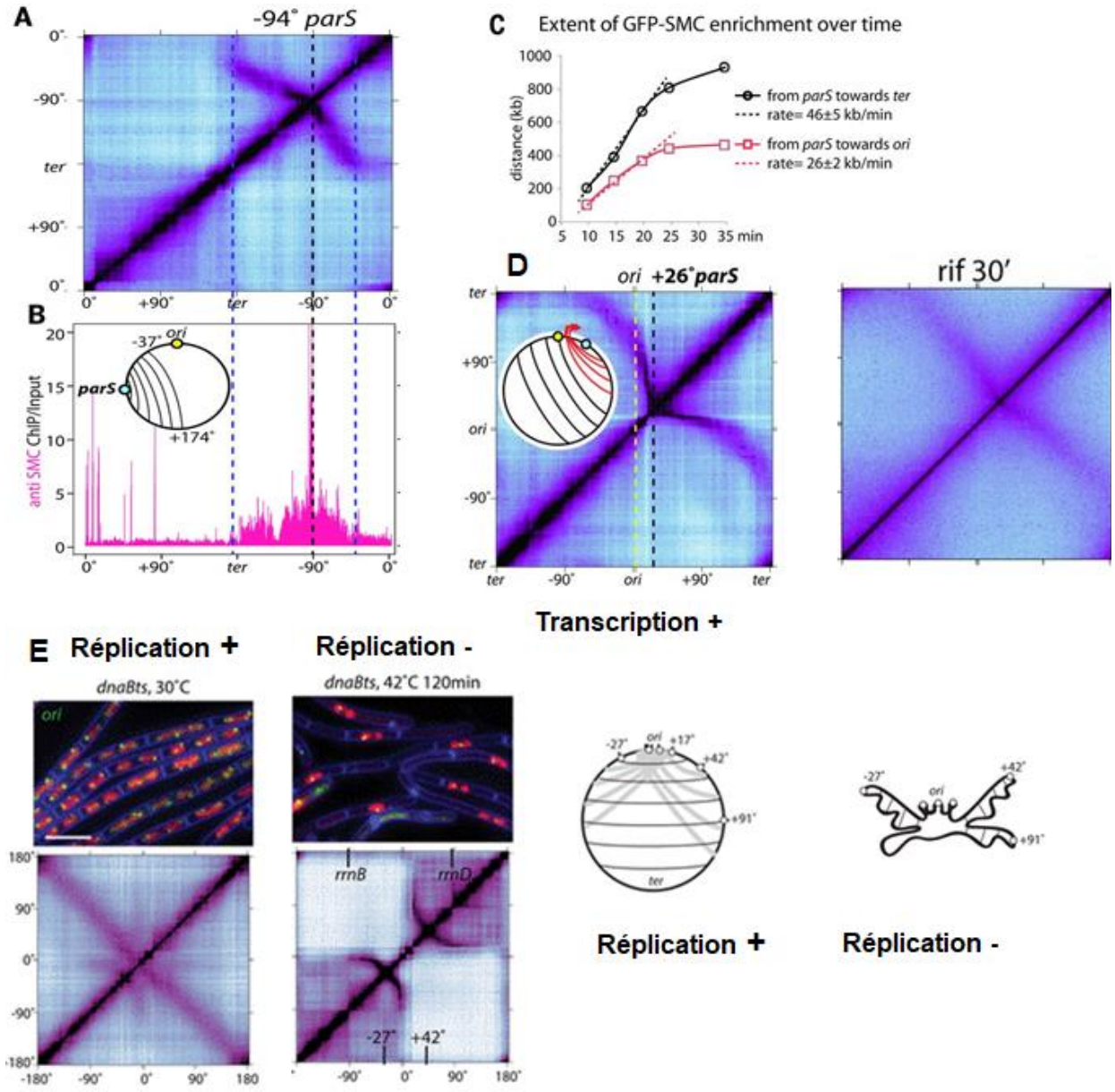


Figure 14 : Les facteurs qui affectent l'activité de Smc-ScpAB chez *B. subtilis*.

(A) Matrice HiC normalisée à 10 Kb-bin, effectuée sur une souche avec un seul *site ParS* -94°.

(B) Profil de ChIP-seq Smc-ScpAB sur la même souche qu'en (A).

(C) Courbe représentatif de l'enrichissement de Scm-ScpAB en fonction du temps dans la souche en (A).

(D) Matrice HiC normalisée à 10 Kb-bin, effectuée sur une souche avec un seul *site ParS* +26° avec ou sans rifampicine 25 µg/ml (inhibiteur de transcription).

(E) La souche *dnaBts* en condition normale (30°C) et réplication arrêtée (42°C) observation microscopique : ADN en rouge coloré par DAPI et focus Ori en vert. Matrices HiC 10 Kb-bin correspondantes et schéma représentatifs du chromosome dans ces deux conditions.

Figures adoptée de (Wang et al. 2017).

La translocation des condensines bactériennes doit s'accommoder des autres processus cellulaires qui agissent concomitamment sur le chromosome tel que la transcription, la réplication, ou la translocation d'autres condensines (Lioy et al. 2020; Wang et al. 2015; 2017). Par exemple chez *B. subtilis*, le déplacement d'un site *parS* induit le chargement de Smc-ScpAB en position ectopique et si la condensine est toujours capable d'aligner les bras du chromosome à partir de cette position, il est à noter que la vitesse de progression est plus rapide vers *ter* que vers l'origine (enrichissement ChIP et HiC). Le ralentissement et la diminution de la vitesse de translocation vers l'origine est due à la rencontre en contresens de la condensine avec des gènes fortement transcrits (tels que les opérons ribosomiques) et peut être supprimée par l'ajout d'un inhibiteur de l'ARN polymérase tel que la rifampicine (Wang et al. 2015; 2017) **(Figure 14)**. La diminution de la portée de translocation de Smc-ScpAB est également observée chez *C. crescentus*, après le changement de l'orientation des gènes par inversion (Tran, Laub, et Le 2017). Il est à noter que cet effet dû à la collision entre la translocation de Smc-ScpAB et la transcription n'est peut-être pas présent chez d'autre bactéries puisque ch*ez P. aeruginosa*, le repositionnement du site *parS* en position ectopique ne provoque aucune asymétrie dans la formation de la seconde diagonale (Lioy et al. 2020) **(Figure 19)**.

L'activité de Smc-ScpAB est également affectée par la réplication. Cela a été observé par HiC chez *P. aeruginosa* dans des souches avec des sites *parS* déplacés ou avec deux origines de réplication (Lioy et al. 2020), ou chez *C. crescentus* et *B. subtilis* après blocage de l'initiation de la réplication (Wang et al. 2017). Chez *B. subtilis*, le blocage de la réplication pendant 120 min induit un effet drastique sur la conformation du chromosome ; une augmentation des contacts chromosomiques à courte distance en *cis* est détectée au niveau de la région Ori, alors que la deuxième diagonale n'est plus détectée (Wang et al. 2017). On peut noter cependant que les sites *parS* les plus éloignés de l'origine restent actifs puisque les contacts intra-bras chromosomiques en *cis* augmentent (Wang et al. 2017) **(Figure 14)**..

Smc-ScpAB chez *C. crescentus* maintient l'alignement des bras du chromosome autour du site *parS* pour assurer une ségrégation efficace. Cela se traduit par des contacts entre la région *Ori* et *Ter* sur les matrices de contacts HiC (Le et al. 2013). Le blocage de l'initiation de réplication induit une augmentation du volume de la cellule, l'efficacité d'alignement des bras du chromosome diminue drastiquement en s'éloignant de la région Ori (Tran, Laub, et Le 2017).

En se basant sur les matrices HiC dans différents contextes génétiques (nombre de *sites parS* variable), il a été observé en absence de réplication l'apparition de formes complexes à partir de 2 *sites parS*. Les simulations bioinformatiques montrent que ces structures sont le résultat

de collisions entre les complexes Smc-ScpAB. Il a été également proposé que ces structures deviennent de plus en plus complexes en raison du chargement successif des complexes Smc-ScpAB (Brandão et al. 2021). Les auteurs proposent qu'un complexe Smc-ScpAB qui forme une boucle dans le sens Ori-Ter est capable de traverser un autre complexe Smc-ScpAB qui forme une autre boucle dans un sens différent. Cette collision est possible dans des conditions particulières et induit un ralentissement de la vitesse de Smc-ScpAB dans les régions entre les sites *pars* (Brandão et al. 2021). Une autre étude a montré par HiC et ChIP-seq que le nombre élevé de sites *parS*, la transcription forte en proximité de l'origine de réplication et la forte expression de Smc-ScpAB augmentent les collisions des complexes Smc-ScpAB et diminuent leurs stabilités sur l'ADN (Anchimiuk et al. 2021) **(Figure 15)**.

En résumé, la condensine bactérienne Smc-ScpAB est capable de reconnaître les structure d'ADN formées par ParB/*parS*, de former des boucles d'ADN symétrique avec un mécanisme topologique ou pseudo-topologique, ce qui expliquerait le ralentissement de son activité face aux obstacles tels que la transcription et la translocation d'autres complexes Smc-ScpAB. La stabilité de Smc-ScpAB sur les chromosomes face aux obstacles nécessite un ajustement fin de son activité ATPase ce qui expliquerait probablement l'incapacité des mutants des régions coiled-coil à se traverser (Anchimiuk et al. 2021).

c. Le déchargement de Smc-ScpAB

Chez *B. subtilis*, l'intensité de la seconde diagonale produite par l'action de Smc-ScpAB ainsi que l'enrichissement de la condensine sur l'ADN diminuent à proximité de la séquence *dif*. Cet effet est encore plus visible quand un site *parS* est placé au milieu de l'un des bras du chromosome (Karaboja et al. 2021) ; il résulte de la fixation de la protéine XerD sur des sites spécifiques. XerD est une protéine recombinase spécifique de site qui, en combinaison avec XerC, permet la résolution des dimères de chromosomes formés par recombinaison homologue. Le complexe XerCD catalyse une recombinaison spécifique de site pour séparer et ségréger les chromosomes néo-répliqués. Les expériences de ChIP-seq de XerD montrent que, contrairement à XerC qui ne se fixe spécifiquement que sur le *site dif*, XerD reconnaît 5 autres sites appelés *XDS* (*XerD site*) et distribués autour de *dif* **(Figure 16)** (Karaboja et al. 2021). La fixation de XerD sur *XDS* semble jouer un rôle de déchargement de Smc-ScpAB, même si pour avoir un effet convaincant sur les matrices de contact, une cassette artificielle composée de 12 *XDS* consécutifs est nécessaire. Ainsi l'insertion de 12 *XDS* au milieu du bras gauche du chromosome de *B. subtilis* bloque la progression de la condensine sur les deux bras. Cette action de déchargement du complexe Smc-ScpAB est indépendante de XerC et de *dif*, mais également

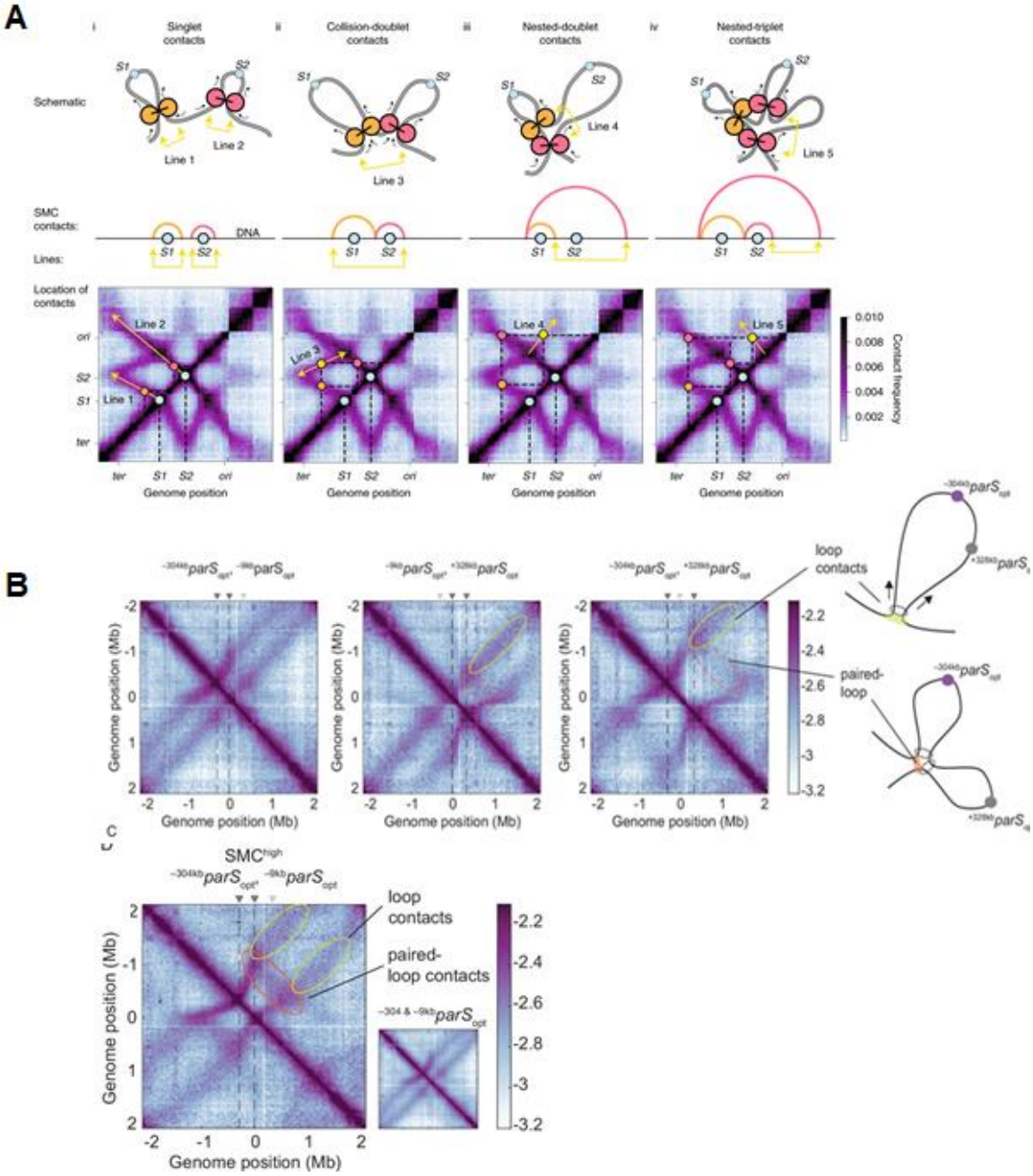


Figure 15 : Collision des complexes Smc-ScpAB chez *B. subtilis*.

(A) Des formes complexes apparaissent sur les matrices de HiC des souches qui contienent 2 *sites ParS* ou plus. Un schéma explicatif propose une interprétation de ces structures.

(B) Matrices 3C-seq 10 Kb-bin obtenus de souches qui contient également deux *sites ParS à* différentes positions sur le chromosome des structures similaires à (a) sont aussi observée.

(C) Comparaison entre deux matrices obtenus dans deux conditions d'expression de Smc-ScpAB différente : grande matrice, Smc-ScpAB est surexprimé; petite matrice, expression *WT*.

Figures adoptées de (Brandão et al. 2021; Anchimiuk et al. 2021).

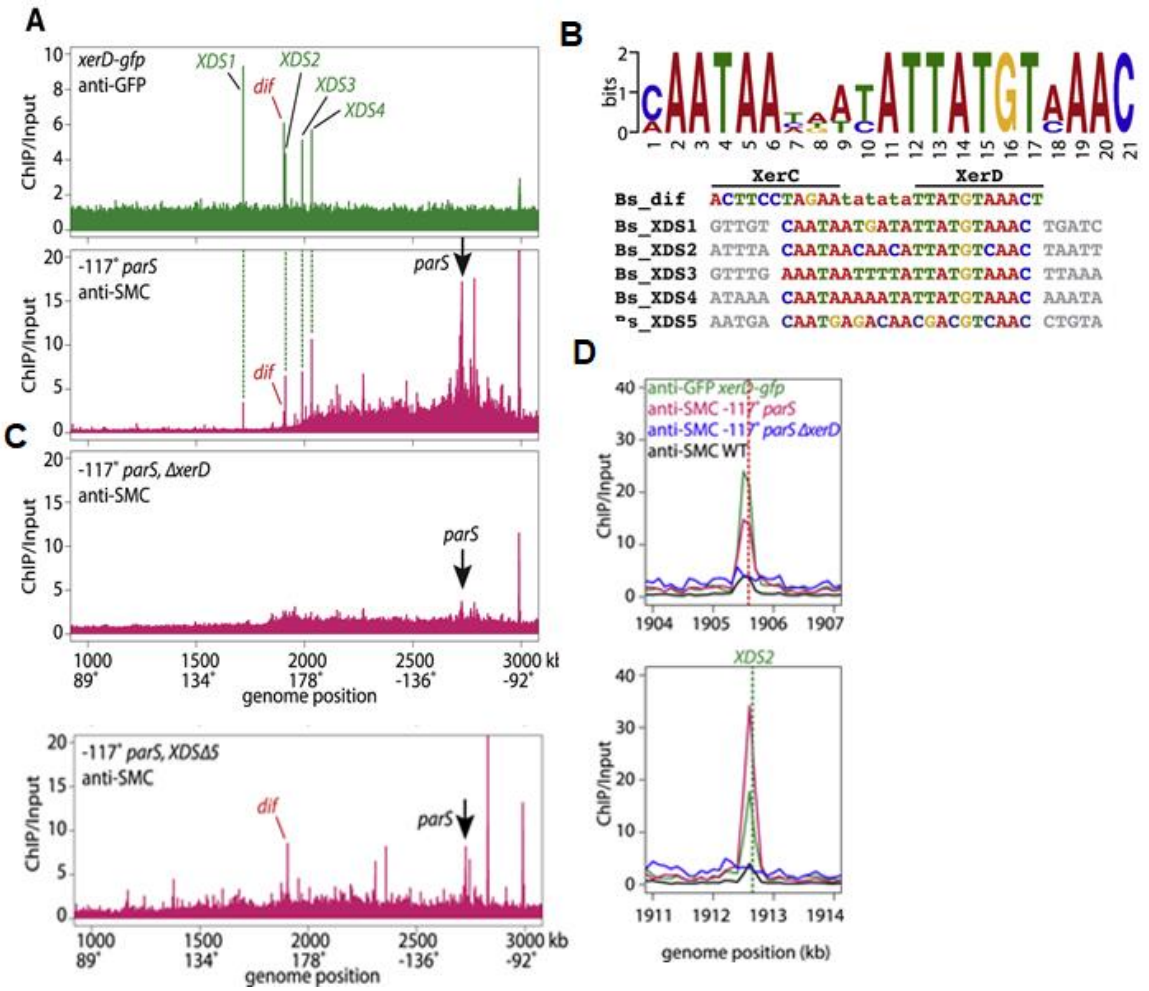


Figure 16 : Déchargement de Smc-ScpAB par XerD chez *B. subtilis*.
(A) ChIP-seq de XerD, 4 pics sont identifiés en plus de *dif*.
(B) séquence consensus *des sites XDS* obtenus par ChIP-seq en (A).
(C) Enrichissement de Smc-ScpAB dans une souche avec un seul *site ParS* à -117° (flèche noire) en haut; au milieu ChIP-seq Smc-ScpAB dans la souche *ParS* -117° *ΔXerD*; en bas ChIP-seq Smc-ScpAB dans la souche ParS -117° *ΔXDS1-5*.
(D) superposition des ChIP XerD en vert, et de Smc dans plusieurs conditions rouge : souche *ParS -117°*, bleu: souche *ParS -117° ΔXerD* et noir dans une souche WT; au niveau des site *dif* et *XDS2* , ChIP 100 pb-bin.
Figure adopté de (Karaboja et al. 2021).

de la distance au site *parS* ectopique et d'autres facteurs de ségrégation du Ter comme FtsK. Par ailleurs, un mutant d'activité catalytique de recombinaison ($XerD^{Y277F}$) est capable de décharger Smc-ScpAB, ce qui démontre que le déchargement de Smc-ScpAB n'est pas une conséquence indirecte du clivage au niveau des *sites XDS* (Karaboja et al. 2021). Cette activité de XerD a également été observée chez *Staphylococcus aureus* (Karaboja et al. 2021) **(Figure 17)**.

Le mécanisme moléculaire du déchargement de Smc-ScpAB du chromosome n'est pas encore établi. On ne sait pas encore à ce stade si l'effet de XerD est direct via un contact avec le complexe Smc-ScpAB ou si le déchargement par XerD est indirect via un autre facteur non identifié. Toutefois, l'analyse fine des ChIP-seq de Smc-ScpAB montre des pics du complexe au niveau des *sites XDS*, que ce signal augmente lors du rapprochement du site *parS* du terminus et qu'il est dépendant de la présence de XerD (Karaboja et al. 2021); ces différentes observations suggèrent une interaction directe entre Smc-ScpAB et XerD.

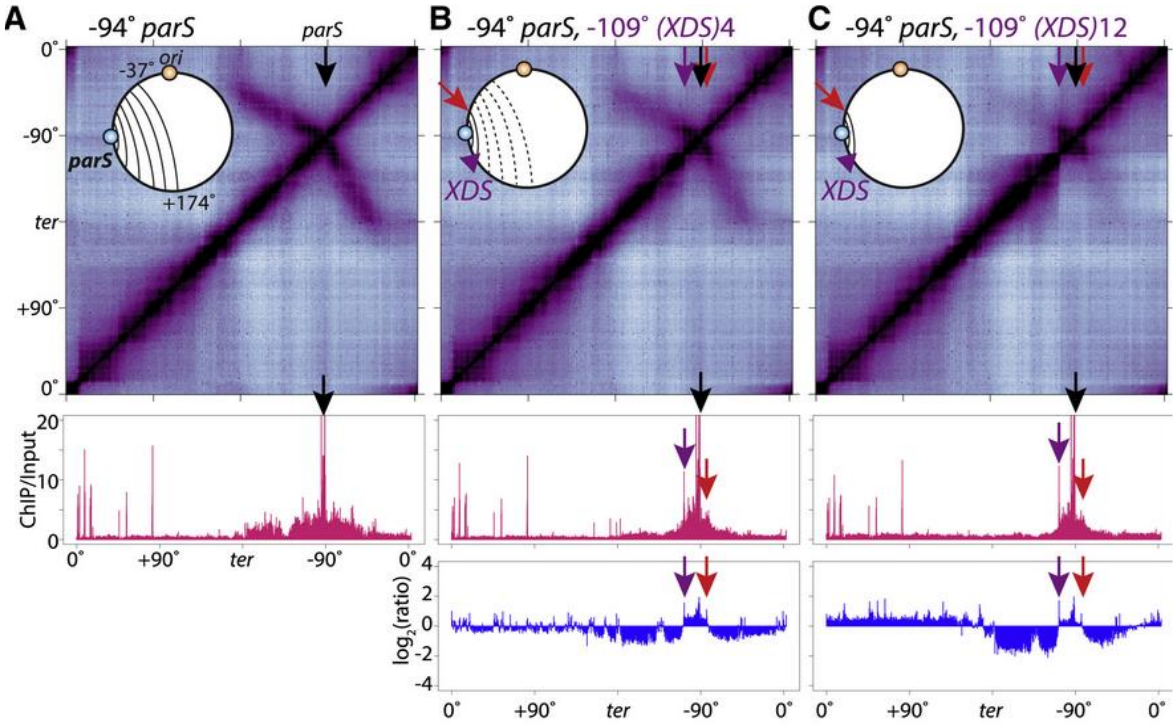


Figure 17 : Efficacité du déchargement de Smc-ScpAB par XerD/*XDS* chez B. subtilis.
(A) Matrice HiC normalisée 10 Kb-bin, effectuée sur une souche avec un seul *site parS* -94°, la flèche noire montre la position du site *parS* sur la matrice HiC et sur le profil d'enrichissement de Smc-ScpAB en bas obtenus par ChIP-seq Smc
(B) Matrice de contacts obtenus à partir d'une souche *parS* -94°où une cassette de (*XDS*)4 est inséré à -109°, la flèche violette montre le site d'insertion de la cassette (*XDS*)4 sur le chromosome en position -109°, tandis que la flèche rouge indique la portée de l'alignement du chromosome. En bas le profil de l'enrichissement de Smc sur le chromosome en rose, ainsi que le ratio entre l'enrichissement de Smc avant et après l'insertion de la cassette (*XDS*)4(en bleu).
(C Matrice de contacts obtenue à partir d'une souche parS -94° où une cassette de (*XDS*)12 est insérée à -109°. La flèche violette montre le site d'insertion de la cassette (*XDS*)12 sur le chromosome en position -109°, tandis que la flèche rouge indique la portée de l'alignement du chromosome. En bas, on trouve le profil d'enrichissement de Smc sur le chromosome en rose, ainsi que le ratio entre l'enrichissement de Smc avant et après l'insertion de la cassette (*XDS*)12 en bleu.
Figure adoptée de (Karaboja et al. 2021).

2. MksBEF

Chez *P. aeroginosa*, la délétion de *mksBEF* n'a pas d'effets détectables sur la conformation du chromosome révélé par une matrice de HiC. Mais de façon surprenante, en l'absence de Smc-ScpAB, MksBEF promeut des contacts en *cis*, le long des bras de réplication, au-delà de 800 kb **(Figure 18 c, d et g)** (Lioy et al. 2020). Plusieurs expériences provoquant un découplage entre le chargement de Smc-ScpAB sur les sites *parS* et l'origine de réplication ont permis de mettre en évidence l'action de MksBEF sur le chromosome. Ainsi le déplacement du site de chargement de Smc-ScpAB ou l'insertion d'une deuxième origine de réplication sur un bras du chromosome a pour effet de retarder le chargement de Smc-ScpAB dans les régions neorépliquées, générant ainsi artificiellement une région accessible à MksBEF (Lioy et al. 2020). On peut donc suivre l'action de MksBEF dans des régions néo-répliquées et non affectées par l'activité d'une autre condensine ; dans ces conditions, MksBEF promeut des contacts en *cis* jusqu'à environ 800 kb, ce qui suggère que l'activité de cette condensine pourrait être couplée au processus de réplication **(Figure 19)**.

Il est important de distinguer l'activité de conformation du chromosome par MksBEF et son activité de ségrégation. En effet, les contacts en *cis* à longue distance ne sont pas toujours associés à la bonne ségrégation des chromosomes, comme on peut l'observer chez un mutant *parA* de *P. aeruginosa*, où MksBEF complémente l'absence de l'activité du système ParABS sans pour autant introduire des contacts en *cis* à longue distance (Lioy et al. 2020).

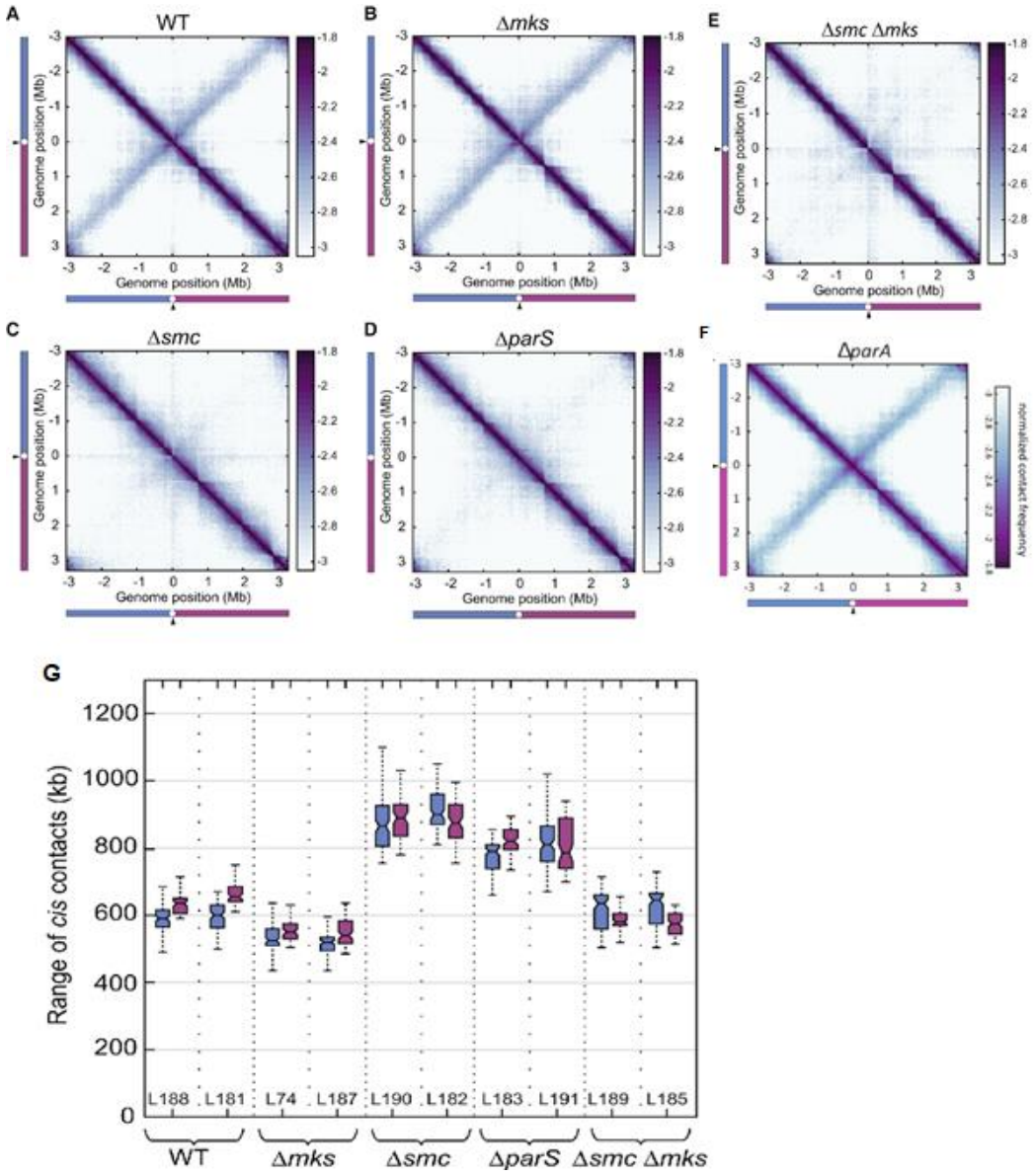


Figure 18 : Conformation du chromosome de *Pseudomonas aeruginosa* dans différents contextes génétiques.

Matrices normalisées 10 Kb-bin, **(A)** *WT*, **(B)** *Δmks*, **(C)** *Δsmc*, **(D)** *ΔparS*, **(E)** *Δsmc Δmks*, **(F)** *ΔparA*, **(G** La portée des contacts dans chaque souche a été quantifiée en mesurant la largeur de la diagonale principale de chaque bras du chromosome. Le bras droit a été représenté en rose et le bras gauche en bleu . Méthode (Wang et al. 2017)).

Figure adoptée de (Lioy et al. 2020).

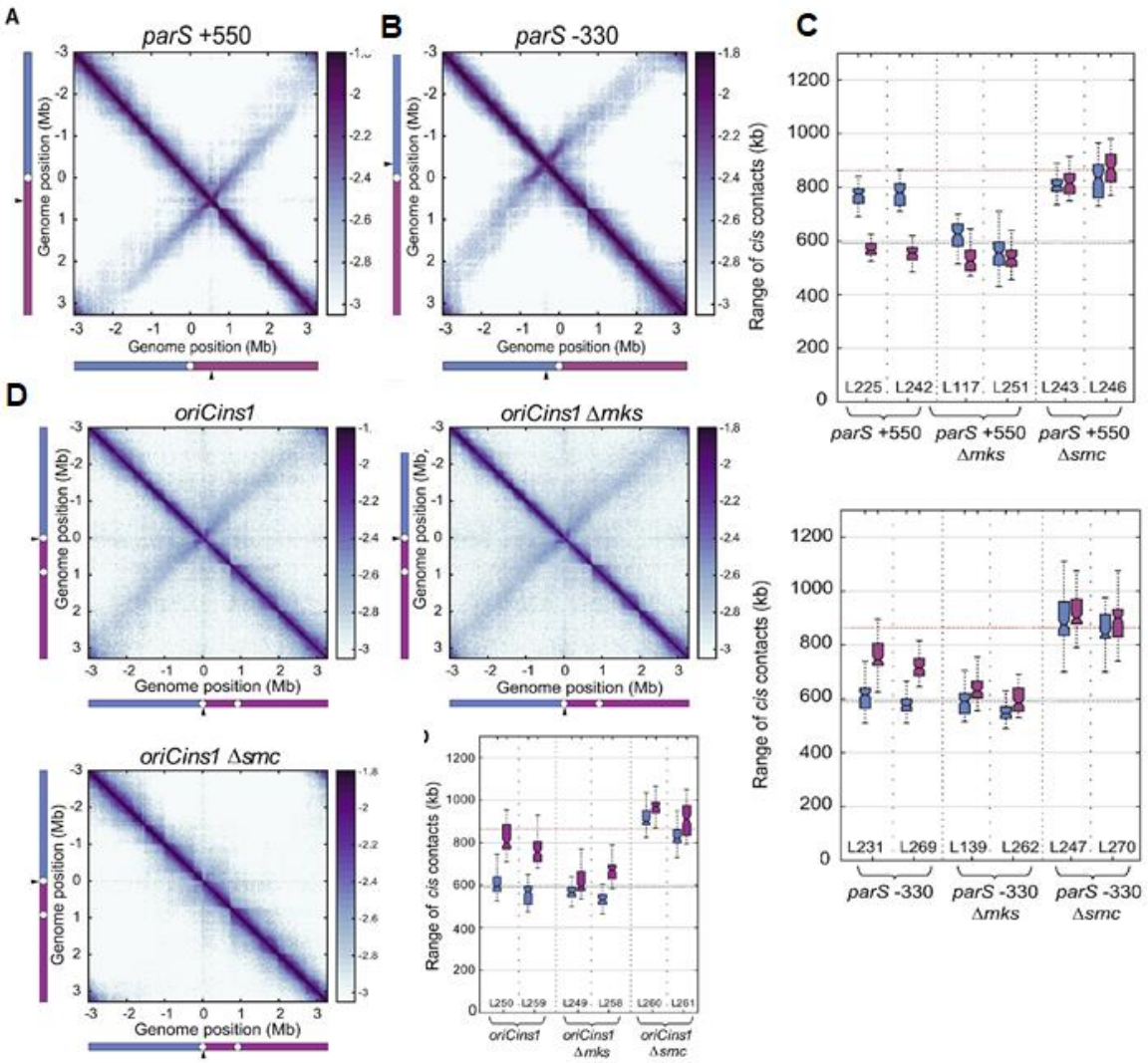


Figure 19 : L'activité de conformation du chromosome par MksBEF en présence de Smc-ScpAB. Matrices normalisées 10 Kb-bin, le bras droit: rose, le bras gauche: bleu

(A) Le *site parS* déplacé à 550 Kb sur le bras droit du chromosome,

(B) Le *site parS* déplacé à 330 Kb du bras gauche du chromosome.

(C) La mesure de la largeur de la diagonale principale de chaque bras du chromosome, méthode [157] de la souche *parS +550* et *parS -330*, à des contextes génétiques *Δsmc* et *Δmks*,

(D) Souche avec une deuxième origine de réplication sur le bras droit à 923 Kb de l'origine de réplication *WT "oriCins1"*, *OriCins1 Δmks*, *oriCins1 Δsmc*, quantification des contacts sur les bras du chromosome.

Figure adaptée de (Lioy et al. 2020).

3. MukBEF

a. Activité biochimique et interactions protéiques de MukBEF

MukB est une protéine de 170 kDa (1486 acides aminés) qui, sous forme de dimère, est capable de se fixer *in vitro* sur l'ADN simple et double brin sans avoir besoin de MukF et MukE (Niki et al. 1992; Niki et Yano 2016). MukB possède une région coiled coil de 50 nm, ce qui en fait la condensine la plus longue du monde bactérien. La région « coiled-coil » de MukB est très caractéristique par sa longueur et sa complexité structurale **(Figure 2)**. En effet, cette région est composée de plusieurs éléments structuraux, de la région « Hinge » vers la région « Head » ; on retrouve d'abord un coude (région « Elbow ») qui permet à MukB de se plier en rapprochant les régions « Hinge » et « Head » (Bürmann et al. 2019; 2021). Les mécanismes contrôlant la dynamique du repliement près de la région « Elbow » ne sont pas encore bien compris. On retrouve également dans le région coiled coil, à proximité de la région « Head » deux éléments fonctionnels : la région « Joint » qui se situe à une distance de 100 acides aminés de la région « Head », et la région « Neck » qui se situe entre les régions « Joint » et « Head »(Zawadzka et al. 2018; Bürmann et al. 2021). Ces deux domaines jouent un rôle de stimulation de l'activité ATPase de MukB, en permettant des interactions avec les protéines AcpP (pour la région « Joint ») et MukF (pour la région « Neck ») (Zawadzka et al. 2018; Prince et al. 2021; Woo et al. 2009; Bürmann et al. 2021) **(Figure 20, 21 et 22)**.

Des approches de biochimie, de cristallographie et de cryo-EM ont permis de comprendre les interactions nécessaires à la formation du complexe MukBEF et la conformation nécessaire au complexe pour interagir avec l'ADN. Ainsi il a été montré que la formation du complexe ne nécessite pas la fixation d'ATP ; néanmoins sans ATP, ce complexe est incapable d'interagir avec l'ADN (Niki et al. 1992; Yamazoe et al. 1999; Zawadzka et al. 2018) **(Figure 20)**. En effet la fixation d'ATP par les domaines Head de MukB induit un changement conformationnel. Cette modification induit « l'engagement » et l'interaction des deux domaines Head du dimère de MukB et permet l'interaction du complexe avec l'ADN. Si l'ATP est requis pour le chargement sur l'ADN, son hydrolyse n'est pas nécessaire et des mutants ATPase de MukB (MukBE1407Q) ou des molécules d'ATP non hydrolysables permettent de former des complexes MukBEF-ADN (Woo et al. 2009; Zawadzka et al. 2018).

Contrairement à Smc-ScpAB qui aligne les bras des chromosomes, la formation de boucle d'ADN par MukBEF n'est pas démontrée ; néanmoins un modèle de structure cryo-EM d'un complexe MukBEF-ADN-AcpP-MatP enchâsse deux fragments d'ADN suggérant que la

formation d'une boucle est possible. Cette structure nous informe sur la nature topologique de l'activité de MukBEF, c'est dire que l'ADN passe à l'intérieur de l'anneau de la condensine bactérienne. De plus, les deux fragments d'ADN sont dans deux compartiments différents séparés par MukF et le dimère de MukE (Bürmann et al. 2021) **(Figure 22)**. Des expériences de pontage de cystéine *in vivo* permettant de piéger l'ADN qui passe dans les différents compartiments ont permis de mettre en évidence que l'ADN passe au milieu de l'anneau de MukBEF et que l'activité ATPase de MukB est nécessaire pour cet enchâssement (Bürmann et al. 2021) **(Figure 21)**.

L'activité ATPase de MukB est contrôlée par les interactions différentielles de MukB avec MukE, MukF et l'ADN. Ainsi il a été montré que l'interaction de MukF avec MukB stimule l'activité ATPase de cette dernière (Zawadzka et al. 2018). Des expériences de biochimie ont montré que l'expression de sous-domaines de MukF stimule l'activité ATPase de MukB ce qui a permis d'identifier les surfaces d'interaction impliquées dans cette régulation. La partie C-Terminale de MukF interagit avec une sous-partie du domaine Head (le domaine « Cap »), et le domaine N-Terminal de MukF avec la partie « neck » de MukB ; ces deux interactions stimulent indépendamment l'activité ATPase de MukB (Zawadzka et al. 2018; Woo et al. 2009) **(Figure 20)**. On peut néanmoins noter que la protéine entière a un effet stimulant supérieur à l'addition de ces deux sous-parties suggérant que ce mécanisme de stimulation n'est pas encore complètement compris.

A l'inverse de MukF, MukE a un effet inhibiteur sur l'activité ATPase du complexe MukFB. Toujours *in vitro,* il a été montré que l'ADN contrebalance l'effet inhibiteur de MukE (Zawadzka et al. 2018; Bahng, Kumar, et Marians 2022), et le modèle structural obtenu par cryo-EM du complexe MukBEF-ADN suggère que la molécule d'ADN passe entre le domaine ATPase et le complexe MukF-2MukE, éloignant ainsi MukE du domaine ATPase. Néanmoins, l'effet de l'ADN sur l'activité ATPase de MukB est toujours discuté puisque d'autres expériences de biochimie suggèrent que l'interaction du complexe avec l'ADN ne modifie pas cette activité (Zawadzka et al. 2018; Bürmann et al. 2021; Bahng, Kumar, et Marians 2022).

L'ensemble de ces résultats *in vitro* soulignent l'importance de l'activité ATPase de MukB et sont en partie confirmés *in vivo*, puisque qu'un mutant capable de fixer l'ATP mais incapable de l'hydrolyser ($MukB^{EQ}$) se charge sur le chromosome mais est incapable d'assurer la ségrégation de ce dernier. A l'inverse, un mutant d'interaction avec l'ATP n'interagit pas *in vivo* avec le chromosome ($MukB^{D1406A}$) (Nolivos et al. 2016; Bürmann et al. 2021).

L'un des questionnements majeurs de la structure du complexe MukBEF repose sur sa stœchiométrie. Des expériences de microscopie à haute résolution ont mis en évidence une sous-population de complexe MukBEF (30% des complexe observé) formé de dimères de dimères composés de 4 MukB-4MukE- 2MukF (Badrinarayanan et al. 2012). Des expériences de FRAP montrent que le rétablissement de la fluorescence est également assuré par des molécules sous forme de dimères de dimères(Badrinarayanan et al. 2012). La possibilité que ces dimères de dimères soient la seule population de MukBEF actif est encore en discussion.

Il est proposé que la formation de ce dimère de dimères se fasse *via* une interaction MukF-MukF liant ainsi deux complexes MukB2E2F **(Figure 20)**. Un mutant *mukF*^{M} incapable de dimériser, donc incapable de former les dimères de dimères, a été construit et caractérisé. Ce mutant est toujours capable de stimuler l'activité ATPase de MukB *in vitro*, suggérant que seule sa capacité à former des dimères est affecté (Rajasekar et al. 2019; Zawadzka et al. 2018). Néanmoins, *in vivo*, *mukF*^{M} n'est pas capable de complémenter la délétion de *mukF* suggérant que la forme « dimère de dimère » soit la forme active du complexe MukBEF (Rajasekar et al. 2019). On peut noter que les travaux de Cryo-EM n'ont pas permis d'observer ce complexe, et il est donc difficile de pouvoir conclure avec certitude que le mutant *mukF*^{M} n'est pas affecté dans une autre fonction que la formation de dimères de dimères (Bürmann et al. 2019; 2021).

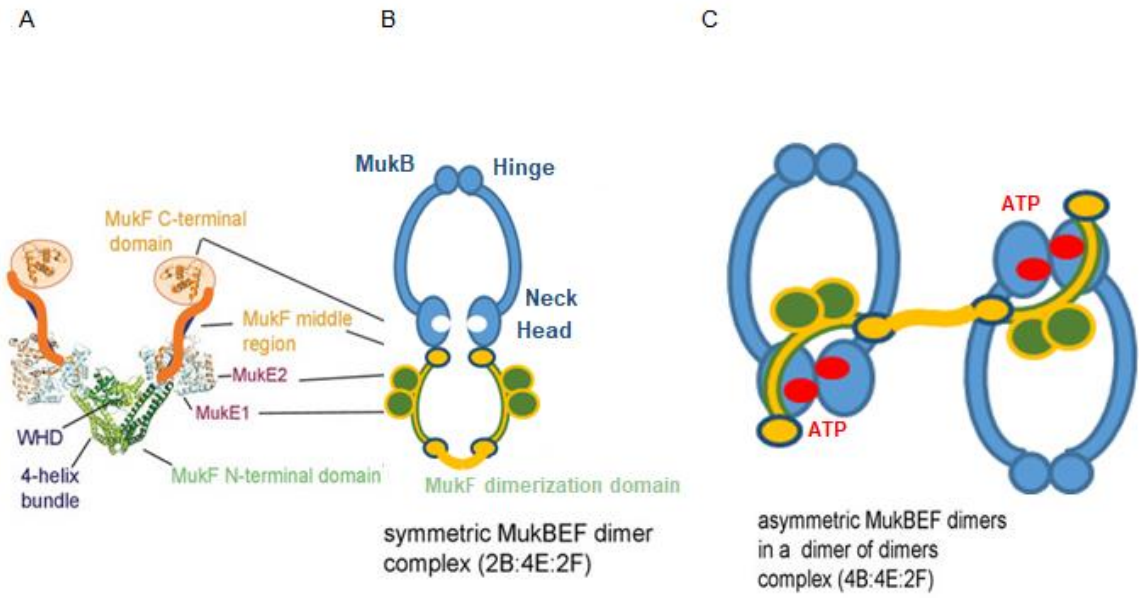


Figure 20 : Représentation schématique du complexe MukBEF basé sur des résultats de cristallographie.

(A) Structure simplifiée d'un dimère de MukF, en interaction avec deux dimères de MukE
(B) Structure schématique du complexe Muk(2B)(2F)(4F),
(C) Schéma représentatif du modèle de dimère de dimère de MukBEF.

Adopté et modifié de (Zawadzka et al. 2018).

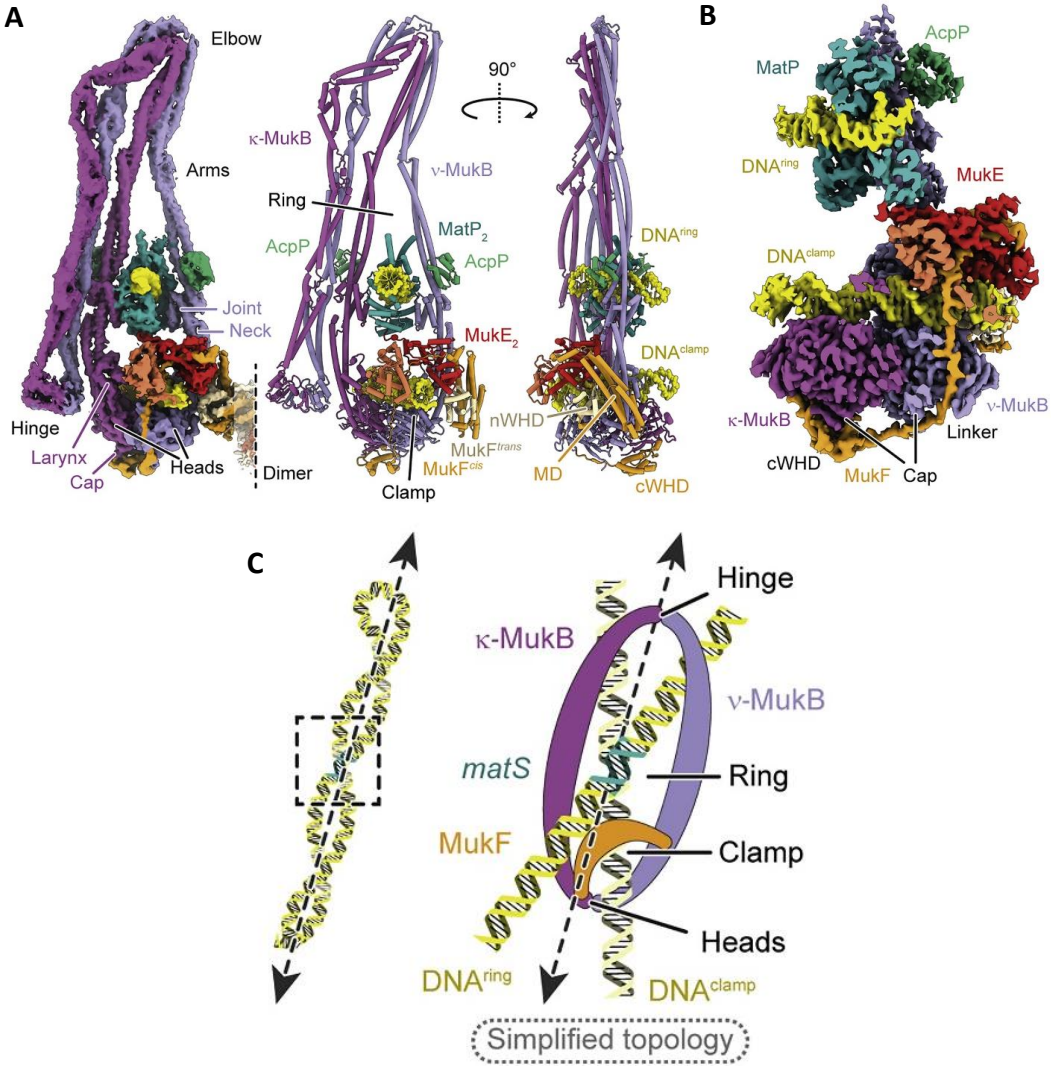


Figure 21 : Structure Cryo-EM de MukBEF en association avec l'ADN et MatP.

(A) Matrice Cryo-EM du complexe MukBEF sur une molécule d'ADN en présence de MatP/*matS*, obtenus à une résolution de 4,6 Å (à gauche, EMDB: EMD-12657), et modèle atomique complet (au milieu, righ).

(B) Coupe à une résolution de 3,1 Å de la région d'interaction avec l'ADN de MukBEF et MatP.

(C) Représentation schématique de la topologie d'interaction de MukBEF avec l'ADN. Figure adaptée de (Bürmann et al. 2021).

Des interactions protéiques entre la condensine bactérienne MukBEF et plusieurs autres facteurs ont été identifiées :

b. AcpP

AcpP est une transporteur d'acides gras chez *E. coli*. C'est une protéine essentielle et abondante. Il a été montré par des expériences de biochimie et de Cryo-EM que AcpP interagit avec MukB au niveau de la région « Joint ». Cette interaction stimule l'activité ATPase de MukBEF d'un facteur 10 in *vitro*. La perturbation de cette interaction *in vivo* par des mutations dans la région « Joint » induit un phénotype de thermosensibilité de type *muk*- (Prince et al. 2021; Bürmann et al. 2021) **(Figure 21 et 22)**.

c. Topo IV

In vivo, MukBEF se colocalise avec Topo IV au niveau de la région Ori, cette colocalisation est maintenue durant tout le cycle cellulaire, même en absence de réplication. De plus, la localisation de Topo IV dépend de la présence de MukBEF et n'est pas observée en contexte *muk*- (Nicolas et al. 2014; Nolivos et al. 2016). Une interaction directe entre la région Hinge de MukB et la sous-unité ParC de TopoIV a été détectée *in vitro* (G. L. Fisher et al. 2021). Récemment des données obtenues *in vitro* suggèrent que l'interaction Hinge-ParC inhibe l'activité ATPase du complexe MukBEF. Plusieurs modèles proposent que MukB et Topo IV pourraient être impliqués dans la séparation des catenanes formées par la réplication. A ce jour, aucun résultat n'a permis d'étayer cette hypothèse ni de démontrer l'existence de telles structures (G. L. Fisher et al. 2021; Joshi et al. 2013; Conin et al. 2022).

d. MatP

En se basant sur des approches de biochimie *in vitro* et de double hybride chez *E.coli,* il été montré que MatP interagit avec la région Hinge dimérisée de MukB (Nolivos et al. 2016). Cette interaction a été décrite comme une interaction faible et transitoire. En effet par chromatographie d'affinité, le complexe MukBEF et le hinge de MukB retiennent le mutant MatPΔC18. De la même façon, MatP retient MukB et/ou MukBEF d'une manière dépendante de MukB. Ainsi un modèle d'interaction MukB2-hinge et dimère de MatP suggère une stœchiométrie d'interaction de 1:1, sur lequel les séquences *matS* sont en compétition avec le hinge pour interagir avec MatP (Nolivos et al. 2016; G. L. Fisher et al. 2021). Ce modèle est basé sur une combinaison d'approches de chromatographie et de spectroscopie de masse, confirmé par des expériences de microscopie de fluorescence *in vivo*. Il est à noter que le modèle nécessite plus de preuves pour démontrer la délocalisation au niveau du Ter du complexe MukBEF par un dimère de MatP en solution avec une interaction faible. De plus, il n'est pas

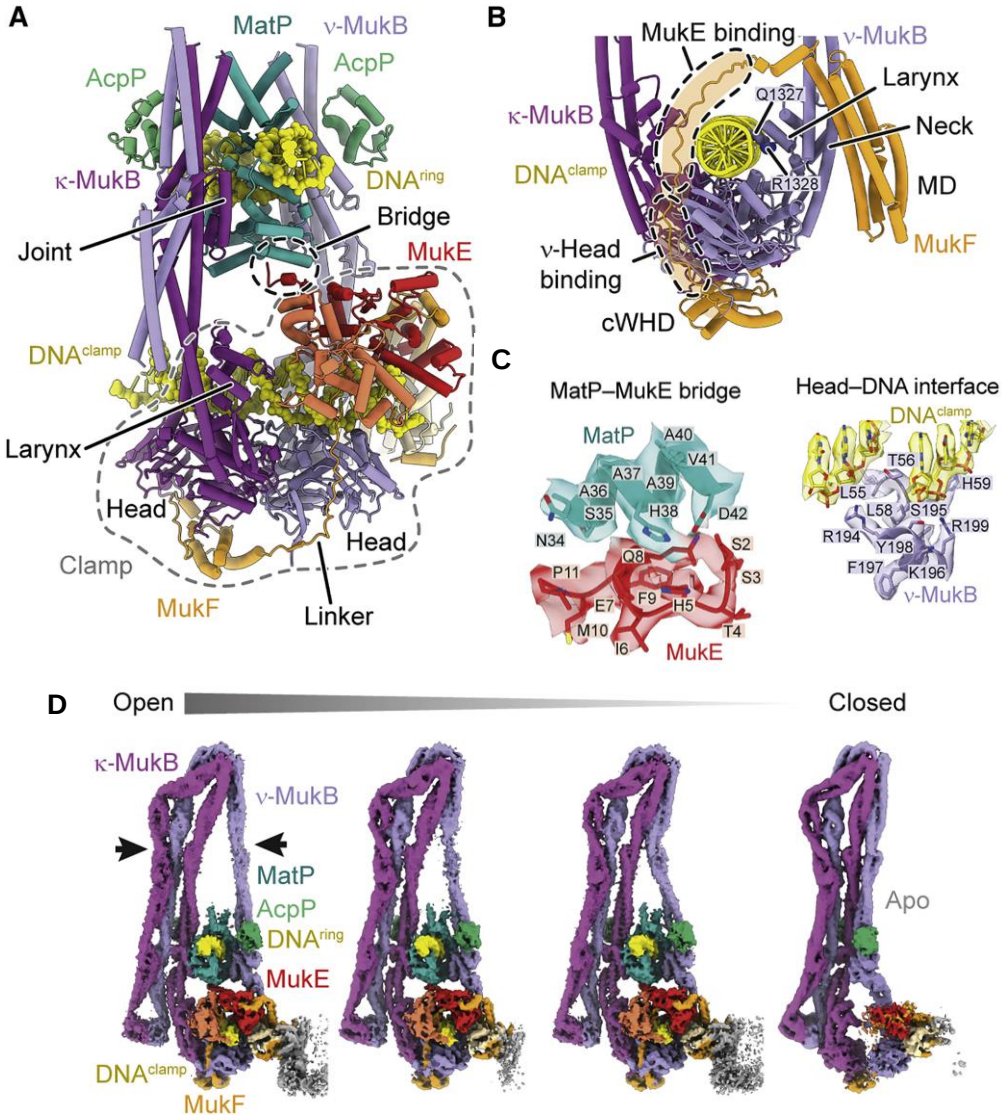


Figure 22 : Changement de conformation du complexe MukBEF lors de l'interaction avec MatP/*matS*

(A) Model de la fixation du domaine ATPase sur l'ADN, qui montre la proximité de MatP-joint et MatP-MukE,.

(B) Conformation de MukF lors de la fixation de MukBEF sur l'AND.

(C) Interfaces d'interaction de MatP-MukE à gauche, et du domaine ATPase de MukB avec l'ADN à droite.

(D) Un modèle de détachement de MukBEF de l'ADN lors de l'interaction avec MatP/*matS*, ce modèle montre les différents conformations adoptées par MukBEF pour exclure l'ADN de l'anneau, ouverte à gauche vers fermée à droite.

Adapté de (Bürmann et al. 2021).

clairement établi pourquoi le mutant MatPΔC18 interagit en double hybride avec le hinge tandis que MatP n'interagit pas (Nolivos et al. 2016; G. L. Fisher et al. 2021).

La structure cryo-EM du complexe MukBEF-ADN-MatP, montre une proximité de MatP avec la région « Joint » de MukB et de MatP avec la région N-terminal de MukE. Ainsi, il a été proposé que ces deux interfaces pourraient avoir une implication fonctionnelle (Bürmann et al. 2021) **(Figure 22)**.

e. Conformation du chromosome par MukBEF

MukBEF, comme les autres condensines bactériennes, intervient dans la conformation du chromosome. Chez *E. coli*, *V. cholerae* et *P. aeruginosa*, les expériences de capture de conformation de chromosome montrent que MukBEF promeut des contacts de plus de 800 kb. Ces contacts impliquent des interactions en *cis* le long des bras du chromosome, comme le réalise MksBEF (Lioy, Junier, et Boccard 2021; Lioy et al. 2018; 2020) **(Figure 23 et 24)**. Chez *E. coli*, l'activité de MukBEF est également détectée par des expériences de recombinaison génétique qui ont permis de définir les macrodomaines (Valens et al. 2004).

D'une manière remarquable, l'activité de MukBEF chez *E. coli* est absente du MD Ter. La comparaison entre les contextes génétiques *WT*, *Δmuk* et *ΔmatP* montrent que MukBEF promeut des contacts de longue distance sur tout le chromosome (>900 kb) sauf dans le MD Ter (600 kb) où il est inhibé par le système MatP/*matS*. En effet, dans le double mutant *Δmuk ΔmatP*, le chromosome dans cette condition adopte une conformation similaire au Ter dans le context *WT*, avec des contacts d'environ 600 kb, ce qui suggère que le Ter n'est pas le résultat d'une conformation établie par MatP mais qu'il est la conséquence de l'inhibition de MukBEF (Lioy, Junier, et Boccard 2021; Lioy et al. 2018) **(Figure 23)**.

Chez *E. coli*, MukBEF forme un focus au milieu de la cellule à proximité de l'origine de réplication, comme les autres condensines bactériennes Smc-ScpAB et MksBEF chez *P. aeruginosa*. Ce focus observé par microscopie à fluorescence est également retrouvé par microscopie à molécule à haute résolution (molécule unique). En effet on retrouve environ 100 molécules de MukBEF, qui se répartissent dans la cellule avec 50% en interaction à l'ADN, alors que le focus est constitué de 8 à 10 molécules de condensine (Badrinarayanan et al. 2012; Stracy et al. 2021). De plus, les observations de la diffusion des molécules suggèrent un échange rapide des molécules, ATP dépendant, cela a été observé par FRAP (Fluorescence Recovery After Photobleaching) (Badrinarayanan et al. 2012).

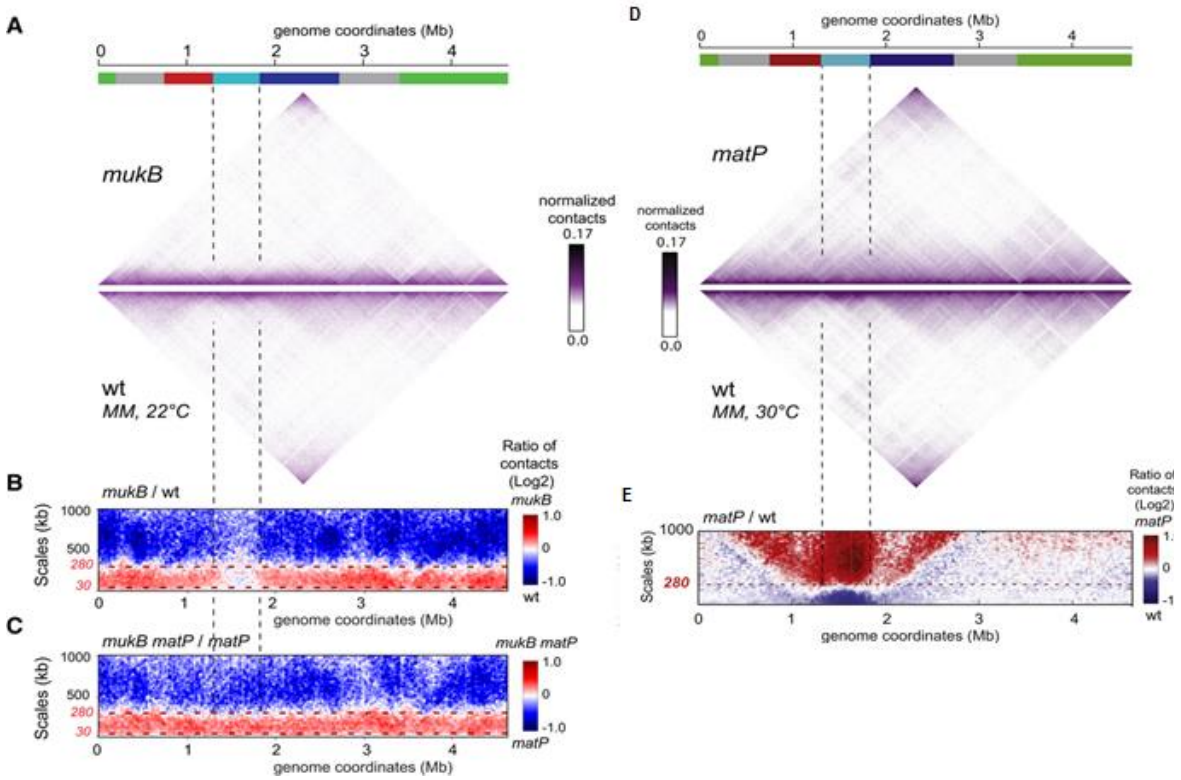


Figure 23 : Rôle de MukB et MatP dans la conformation du chromosome d'*Ecoli*

(A) Matrices de contact du chromosome d'*E.coli* normalisée 5Kb, en haut: *ΔmukB et en bas: WT*.

(B) Ratio de la portée des contacts, représenté en 2D *ΔmukB/WT*,

(C) *ΔmukB ΔmatP/ ΔmatP*

(D) Matrices de contact du chromosome d'*E.coli* normalisée 5Kb, en haut: *ΔmatP et en bas: WT*.

(E) Ratio de la portée des contacts, représenté en 2D *ΔmatP/WT*.

Figure adaptée à partir de la référence (Lioy et al. 2018).

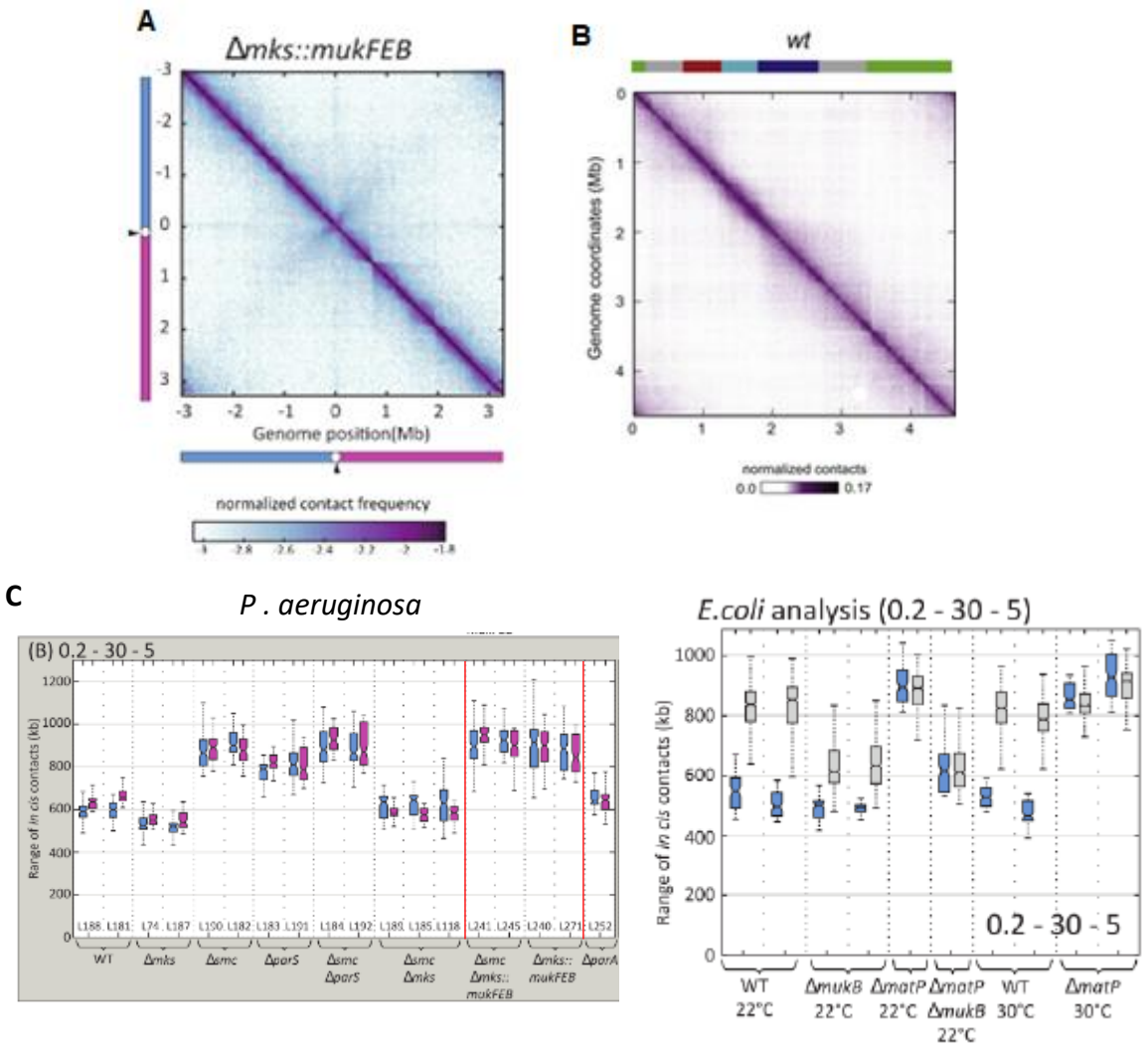


Figure 24 : Impact de l'expréssion de *mukBEF* sur la conformation des chromosomes de *P. aeruginosa* et d'*E.coli*:

(A) Matrice de contacts de 10 Kb-bin du chromosome de *P. aeruginosa* dans une souche *Δmks::mukBEF*,

(B) Matrice de contacts de 5 Kb-bin du chromosome d'*E.coli WT*.

(C) Mesure de la largeur de la diagonale des bras du chromosome chez *P. aeruginosa* left: bleu, right: rose, et *E.coli*, left: bleu, right: gris,

Figure adaptée à partir des références (Lioy et al. 2018; 2020).

Des expériences de microscopie dans des conditions où MukBEF est surexprimé d'un facteur 3 ont également mis en évidence une distribution de MukBEF sur le chromosome. Ainsi, MukBEF couvre le chromosome et permet sa visualisation (Mäkelä et Sherratt 2020) **(Figure 25)**. En accord avec les résultats de 3C, MukBEF ne forme pas de foci dans le domaine Ter lorsque MatP est présent, mais s'associe au Ter dans un contexte *ΔmatP*. D'autres expériences de microscopie à haute résolution sur des cellules vivantes, élargies de façon artificielle et qui ne répliquent pas, ont également montré que MukBEF s'associe aux régions denses du chromosome qui correspondent aux bras du chromosome à l'exception du Ter (Japaridze et al. 2022).

Il est à noter que l'activité ATPase de MukBEF est indispensable à la fois pour former des contacts de >900 kb sur le chromosome et pour former des foci recouvrant le chromosome. A l'inverse, le focus de MukBEF au niveau de l'origine de réplication est également observé dans un mutant MukBE1407Q ce qui suppose que la nature de ces deux structures microscopiques soit différente (Nolivos et al. 2016).

On retrouve l'inhibition de MukBEF par le système MatP/*matS* chez *V. cholerae* (communication personnelle D. Mazel). D'une manière générale, on pourrait imaginer que ce type de régulation soit conservé chez toutes les bactéries qui portent le groupe de gènes co-occurrents de la Dam méthyltransférase (γ-protéobactéries) et qui possèdent à la fois *matP* et *mukBEF*. Les mécanismes moléculaires de cette inhibition ainsi que sa fonction n'ont pas été élucidés. La délétion de *matP* permet à MukBEF d'exercer son activité au sein du MD Ter, néanmoins les contacts longues distances qui apparaissent ne semblent pas avoir un effet sur la physiologie de la cellule en milieu minimum (Glucose, casa-amino acides) (Lioy et al. 2018; Mäkelä et Sherratt 2020). Il est important de noter que l'inhibition de MukBEF ne dépend pas de la fixation du MD Ter au septum de division par MatP, puisque l'abolition de cette fixation dans les mutants de *matPΔC20* ou *ΔzapB* (partenaire d'interaction de MatP avec le septum) n'affecte pas cette inhibition (Lioy et al. 2018).

Chez *P. aeruginosa,* MukBEF est capable de complémenter la délétion de *mksBEF* en restaurant la ségrégation et les contacts à longue distance de plus de 600 kb. *P. aeruginosa* ne possédant pas la cohorte de gènes de la *Dam méthyltransférase,* cela suggère que la condensine MukBEF n'a pas besoin d'un autre facteur pour former ces contacts à longue distance, ou alors qu'il est présent et conservé chez *P. aeruginosa* (Lioy et al. 2020).

Contrairement à MksBEF, MukBEF introduit des contacts en *cis* > 900 kb sur le chromosome de *P. aeruginosa* en présence de Smc-ScpAB, ce qui se traduit par une perte de la deuxième diagonale représentative de l'activité de Smc-ScpAB sur le chromosome (Lioy et al. 2020). Ce résultat pourrait expliquer d'une manière générale l'absence de Smc-ScpAB chez les bactéries qui codent pour MukBEF **(Figure 24)**.

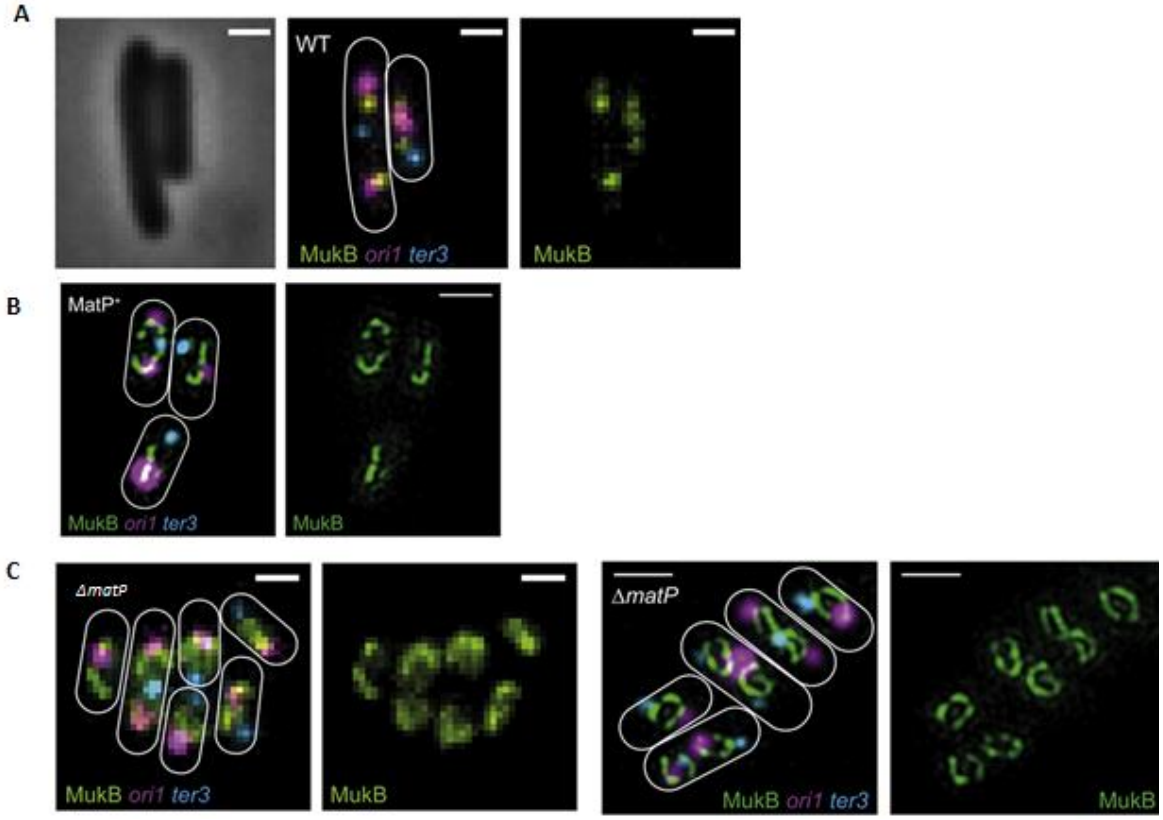


Figure 25 : Observation de MukB-GFP chez *E.coli* formation d'un "corps axial"

(A) Représentation par microscopie à fluorescence 3D-SIM en condition *WT*, où MukB-GFP est en vert, le focus à l'origine de réplication en rose (ori1) et le focus en Ter en bleu (ter3), la barre blanche correspondant à 1 µm.

(B) Représentation par microscopie à fluorescence en condition de surexpression de MukBEF, où MukBEF forme un corps axial sur le chromosome, sauf dans la région Ter.

(C) Représentation par microscopie à fluorescence en condition de surexpression de MukBEF en *ΔmatP*, où MukB forme un corps axial sur l'intégralité du chromosome.

Figure adaptée à partir de la référence (Mäkelä et Sherratt 2020).

C. Projet de thèse

Mon projet de thèse s'inscrit dans une thématique qui vise à appréhender l'action de MukBEF sur le chromosome d'*E. coli*, les mécanismes qui permettent une ségrégation efficace du chromosome et leur régulation.

Des résultats précédemment obtenus au laboratoire ont mis en évidence que MukBEF modifie la conformation du chromosome. Dans un premier volet, nous avons voulu utiliser cette propriété afin de suivre l'activité de MukBEF et de caractériser différentes caractéristiques telles que son chargement sur l'ADN, sa translocation, et son déchargement. L'objectif du second volet visait la caractérisation du mécanisme d'inhibition de l'activité de MukBEF par MatP dans le MD Ter.

I. Caractérisation fonctionnelle de l'activité de la condensine bactérienne MukBEF

Les recherches effectuées sur les condensines et cohésines eucaryotes montrent que la régulation de leur chargement permet de contrôler leurs actions sur le chromosome. Ainsi, en plus de la membrane nucléaire qui pourrait être un bon moyen pour réduire l'accessibilité de la condensine I au chromosome, on retrouve des modifications post-traductionnelles des complexes SMC et des facteurs spécifiques qui assurent un chargement de la condensine II et de la cohésine sur le chromosome. Ces chargements s'effectuent dans des endroits favorables et à des moments précis du cycle cellulaire. De la même façon, il a été montré que la condensine bactérienne Smc-ScpAB est chargée sur le chromosome sur les sites *parS* qui se situent à proximité de l'origine de réplication. Le chargement de MukBEF sur l'ADN n'est par contre pas caractérisé et l'un des buts de ma thèse a été de comprendre si MukBEF se charge sur un site spécifique du chromosome et/ou à un moment particulier du cycle cellulaire.

Nous avons utilisé la capacité de MukBEF à former des contacts en *cis* de longue distance (>900 kb) afin de suivre l'activité de MukBEF et de caractériser le chargement de cette condensine sur l'ADN. L'approche que nous avons développée consiste à réaliser des cinétiques d'induction de MukBEF et de suivre l'apparition des contacts longue distance sur le chromosome grâce aux techniques de 3C-seq/HiC. L'apparition de ces « marques conformationnelles » de l'activité de MukBEF à partir d'un site du chromosome révèlerait un chargement spécifique, tandis que l'apparition « stochastique » de l'activité de MukBEF sur le chromosome suggère un chargement non spécifique. Le suivi de l'activité de MukBEF a

également été effectué dans différentes phases du cycle cellulaire, dans une population de cellules synchronisées.

Les expériences de microscopie montrent l'existence de plusieurs populations de condensines, et montrent également un échange continu entre les populations qui sont liées l'ADN, et celles qui diffusent en solution. De plus, l'étude de la diffusion de l'activité de la condensine MukBEF sur le chromosome peut renseigner sur ses propriétés de translocation du complexe. Par conséquent des expériences de cinétique par ChIP-seq d'une protéine de fusion MukB-tag dans un contexte sauvage ont été effectuées après redémarrage de réplication dans une population de cellules synchronisées.

Un autre aspect du management de la condensine sur le chromosome consiste à déloger la condensine du chromosome. En effet chez les eucaryotes, les mécanismes de déchargement des condensines et de la cohésine sont contrôlés durant le cycle cellulaire. Tout comme le chargement, le déchargement nécessite un mécanisme actif pour extraire le complexe SMC d'une structure d'ADN condensé, ou même par un clivage direct de la kléisine de la cohésine. Chez les bactéries, la condensine Smc-ScpAB de *B. subtilis* est déchargé par le système XerD/*XDS* à proximité du site *dif*, ce qui suggère qu'un système de déchargement de la condensine est également présent chez les bactéries. Par analogie, le système MatP/*matS* pourrait également jouer un rôle similaire. Sachant que la distribution de MukBEF sur le chromosome n'est pas homogène, une perte d'enrichissement de MukBEF pourrait révéler un mécanisme de déchargement actif de la condensine du chromosome. De ce fait, des cinétiques de ChIP-seq MukB-tag ont été effectués dans une population de cellules synchronisées, dans différentes phases du cycle cellulaire.

II. Caractérisation de l'inhibition de MukBEF par le système MatP/matS

Des systèmes de déchargement de condensine/cohésine ont précédemment été caractérisés chez les eucaryotes tels que Cdc48-Ufd1-Npl1 qui décharge la condensine et Pds5-WAPL qui décharge la cohésine. La cohésine est également déchargée du chromosome par le clivage de la kléisine par la Séparase.

Chez les bactéries, notamment chez *B. subtilis*, il a été montré que le système XerD/*XDS* induit le déchargement de Smc-ScpAB dans la région terminale du chromosome. Il semble donc qu'il existe des systèmes de régulation de l'activité de condensine qui empêche leur action sur certaines zones des chromosomes et notamment des régions *ter* des chromosomes bactériens. Chez *E. coli*, nous avons cherché à caractériser l'inhibition de MukBEF par le système

MatP/*matS* en divisant le domaine Ter en deux sous domaines possédant des nombres et distributions de *matS* différents afin d'identifier les déterminants minimaux pour cette inhibition.

Même s'il a été proposé que l'inhibition de la condensine MukBEF résultait de son interaction avec le système MatP/*matS*, il n'est pas clairement établi si cette interaction est similaire à l'interaction de XerD/*XDS* et Smc-ScpAB qui la décharge du chromosome, ou si cette interaction régule l'activité de MukBEF comme dans le cas de SORORIN avec la cohésine. Pour aborder cette question, nous avons essayé de protéger des fragments d'ADN (450 kb et 1 Mb) de l'action de MukBEF par des transpositions de grands segments chromosomiques à l'intérieur du MD Ter. Ainsi la recherche d'activité de MukBEF permettra non seulement de déterminer si les deux fragments disjoints du MD Ter auraient un effet d'insulateur sur la région qui les sépare, mais aussi d'identifier le nombre minimum et/ou la densité de sites *matS* nécessaire pour inhiber MukBEF.

Des interactions physiques entre différents domaines de MukBEF avec MatP ont également été rapportées (Nolivos et al. 2016). Nous avons cherché à reproduire ces interactions afin de générer des mutants d'interaction et de caractériser leur activité *in vivo*. Deux approches ont été choisies : l'une basée sur le double hybride chez la levure visait à générer des banques de mutants et à cribler parmi ces banques des mutants d'interaction, et l'autre impliquant des modifications spécifiques des résidus impliqués dans l'interaction MukBEF/MatP.

RESULTATS

Résultats

Article: “ Activity of MukBEF for chromosome management in *E. coli* and its inhibition by MatP”

Résumé de l’article

Les condensines bactériennes peuvent être réparties en trois sous-familles, dont la plus répandue et la plus étudiée est Smc-ScpAB. Le chargement de cette condensine a été caractérisé chez plusieurs bactéries et s'effectue en un site spécifique appelé *parS* et en association avec ParB, qui permet ce chargement. De ce chargement particulier découle une organisation qui aligne les deux bras du chromosome visibles à la fois en microscopie et en capture de conformation.

En revanche, chez *E. coli*, MukBEF favorise une organisation différente où les deux bras du chromosome sont distribués dans deux moitiés différentes de la cellule. De plus, MukBEF favorise des contacts intra-réplichore de longues distances sur l'ensemble du chromosome, à l'exception de la région Ter où son action est inhibée par le système MatP/*matS*.

Mais jusqu'à ce jour, aucune donnée permettant de comprendre les déterminants du chargement de MukBEF sur le chromosome n'a été publiée. De la même façon, les caractéristiques de l'inhibition de MukBEF par MatP n'ont pas été décrites et font l'objet de cette publication.

Dans cette étude, notre objectif était d'étudier le chargement de la condensine MukBEF sur le chromosome d'*E. coli*. Pour observer l'action de MukBEF, nous avons mis en place un système d'expression inductible de MukBEF grâce à l'IPTG. Ce système permet de compenser l'absence de MukBEF en restaurant la croissance en milieu riche et la ségrégation des chromosomes chez une souche muk-, en présence d'inducteur. Nous avons ainsi pu suivre la cinétique d'induction de MukBEF et observer l'apparition de contacts de longue distance sur une matrice HiC, révélant son activité. Nous avons mis en évidence que 40 minutes après l'induction, des contacts de longue distance apparaissent sur l'ensemble du chromosome (à l'exception du MD Ter), et que ces contacts atteignent un maximum après deux heures. Ce résultat montre que MukBEF ne se charge pas sur le chromosome à partir d'un site particulier, contrairement à SMC-ScpAB, mais sur une multitude de sites tout le long du chromosome.

Pour vérifier si MukBEF peut se charger entre deux domaines Ter possédant des *matS*, nous avons créé des souches où une partie du réplichore droit (RiTer) ou une partie du réplichore

gauche (LiTer) est transposée au milieu du domaine Ter. Nous avons ensuite testé la capacité de MukBEF à se charger sur ces zones transposées entourées de *matS*, par HiC et 3C-seq, et observé des contacts de longue distance, révélant l'activité de MukBEF. Il est important de noter que les deux demi-Ter formées ne présentent pas de contacts de longue distance. Ces expériences ont montré que MukBEF peut se charger entre des sites *matS*, et que 11 et 13 matS sont suffisants pour inhiber MukBEF.

Nous avons ensuite caractérisé l'inhibition de MukBEF par le système MatP/matS. Si les deux fragments Ter avec 13 et 11 *matS* inhibent MukBEF, quel serait le minimum de sites qui pourrait inhiber la formation des contacts de longues distances par MukBEF ? avant de répondre à cette question une cartographie des sites *matS* par ChIP-seq de MatP-Flag a révélé la présence de 28 *matS* dans le MD Ter. Ensuite la transposition de 1Mb du réplichore Left dans différentes positions du MD Ter a permis d'isoler un nombre x décroissant de matS au milieu du réplichore gauche (les souches LiTer x). Les résultats de HiC et 3C-seq, montrent que les contacts au niveau des Ter transposés augmentent progressivement à partir de 7 *matS*. En effet sur le même fragment de Ter, la portée des contacts *cis* est plus longue avec 3 *matS* qu'avec 4 *matS*. Toutefois la portée des contacts est plus lointaine avec 3 *matS* dispersés qu'avec 3 *matS* rapprochés, néanmoins elle est inférieure à la condition *ΔmatP*. Ces résultats suggèrent que l'inhibition de MukBEF est un mécanisme progressif qui augmente avec l'augmentation du nombre de *matS* jusqu'à 9 *matS*.

Les expériences d'induction de MukBEF ont révélé la capacité de MukBEF à se charger sur l'ensemble du chromosome en dehors du MD Ter. Nous avons ensuite examiné la capacité de MukBEF à se charger sur le chromosome en fonction de la réplication. Des expériences de ChIP-seq de MukB-Flag sur des populations de cellules *DnaC2ts* synchronisées ont été réalisée afin de révéler la cinétique de MukB sur le chromosome après redémarrage de la réplication. Les résultats ont montré que MukB occupe tous le chromosome en dehors du MD Ter en absence de réplication. Cependant, un enrichissement de MukB sur les séquences néorépliquées est observé après le redémarrage de la réplication. Ces résultats suggèrent que MukBEF se charge préférentiellement sur de l'ADN néorépliqué.

Lors de la réplication du MD Ter, l'enrichissement de MukB diminue rapidement avant les bordures du MD Ter. Cela montre que l'enrichissement de MukB ne suit pas la fourche de réplication dans le MD Ter. De plus, une diminution de l'enrichissement similaire est observée une souche LiTer7 losque la replication traverse le Ter transposé. Ces resultats suggèrent que

le mécanisme d'inhibition de MukBEF par MatP/*matS* consiste à décharger la condensine du chromosome.

Néanmoins, la réplication n'est pas un facteur essentiel au chargement de MukBEF sur l'ADN, En effet, l'induction de MukBEF dans des populations de cellules synchronisées montre que la condensine forme des contacts *cis* de longues distances en dehors du MD Ter, même en absence de réplication après 2h d'induction, et que le redémarrage de réplication n'affecte pas les contacts formés.

Bien que 9 matS suffisent à inhiber la formation des contacts cis par MukBEF, 28 *matS* forment le MD Ter chez *E. coli*. Afin d'avoir une idée plus précise de cette inhibition, nous avons analysé la distribution des *matS* sur les génomes de 16 bactéries en utilisant le consensus de *matS* d'*E. coli* comme référence. Nous avons ainsi pu identifié les Ter de ces bactéries et observé une augmentation de la densité des *matS* à proximité du site *dif*.

L'ensemble de ces résultats fait l'objet d'une publication en cours de rédaction, la version actuelle est la suivante :

Activity of MukBEF for chromosome management in E. coli and its inhibition by MatP

Mohammed Seba, Frédéric Boccard, Stéphane Duigou

Université Paris-Saclay, CEA, CNRS, Institute for Integrative Biology of the Cell (I2BC), 91198, Gif-sur-Yvette, France.

** Correspondence: frederic.boccard@i2bc.paris-saclay.fr; stephane.duigou@i2bc.paris-saclay.fr*

Abstract

While different features for the activity of the bacterial canonical SMC complex, Smc-ScpAB, have been described in different bacteria, not much is known about the way chromosomes in enterobacteria interact with their SMC complex, MukBEF. Here we used a number of *in vivo* assays in *E. coli* to reveal how MukBEF controls chromosome conformation and how the MatP/*matS* system prevents MukBEF activity. Our results indicate that the loading of MukBEF occurs preferentially in newly replicated DNA, at multiple loci on the chromosome where it can promote long-range contacts in *cis* even though MukBEF can promote long-range contacts in the absence of replication. Using HiC and ChIP-seq analyses in strains with rearranged chromosomes, the prevention of MukBEF activity increases with the number of *matS* sites and this effect likely results from the unloading of MukBEF by MatP. Together, our results uncover striking differences in the way two different SMC complexes in bacteria interact with the chromosome and control its conformation.

Keywords: SMC complex /condensin / Chromosome conformation / MatP / MukBEF /

Introduction

SMC complexes play key roles in many processes involved in chromosome management, from genome replication and maintenance, interphase chromatin organization, sister-chromatids alignment, chromosome folding and condensing, DNA recombination at specific stages of the cell cycle (Yatskevich et al., 2019). A general model for SMC complex activity relies on their properties to bridge DNA elements and by doing so build DNA loops in cis and hold together the sister chromatids in trans; to do that, they bind DNA and processively extrude a DNA loop in a ATPase-driven loop extrusion, thereby compacting and organizing DNA (Davidson et al., 2019; Ganji et al., 2018; Kong et al., 2020). Yet many molecular features that determines the activity of the various SMC complexes are still unclear and it is not known whether they work using the same basal mechanisms (Bürmann et al., 2021; Davidson et al., 2019; Pradhan et al., 2022). For example, it is not yet clear whether I) the activity of SMC complexes is mediated by a single complex or if it involves cooperation between several complexes that organize into dimers or even oligomers (Badrinarayanan et al., 2012; Hassler et al., 2018), ii) the DNA extrusion involves a topological or nontopological mechanism, i.e. does the DNA pass through the SMC ring topologically (Bürmann et al., 2021; Davidson et al., 2019; Pradhan et al., 2022) , iii) the activity of SMC complexes relies on the folding capacities of the SMC coiled-coil arms facilitating large-scale conformational changes (Bürmann et al., 2019), and iv) multiple complexes that encounter one another on the same DNA in living cells bypass each other or collide (Anchimiuk et al., 2021; Brandão et al., 2021). Cohesin and Condensin are the most characterized SMC complexes found in many eukaryotes. In bacteria, three different forms of SMC-like complexes defined as bacterial condensins have been identified, Smc-ScpAB, MukBEF, MksBEF; they are considered functionally related to condensins as they are thought to compact chromosomes and facilitate the segregation of sister chromosomes (Lioy et al., 2020a, 2018a, p. 2; Marbouty et al., 2015). In bacteria, Smc-ScpAB represents the most highly conserved complex, while MukBEF and MksBEF represent diverged condensins (Cobbe and Heck, 2004; Yoshinaga and Inagaki, 2021).

Eukaryotic and prokaryotic SMC complexes are composed at least of 5 subunits: two Smc subunits, a kleisin subunit, and two additional subunits (kite and hawk subunits according to the type of SMC complex). Smc proteins associate with the kleisin protein to form a ring-shaped ATPase assembly. Additional subunits associate with this tripartite complex: the “Kite” family associates with bacterial and archaeal SMC complexes and also with the eukaryotic SMC5/6 complex while the “Hawk” family interacts with condensin and cohesin (Yatskevich et al., 2019). These additional subunits are thought to be required for the activity and to differentiate functions; for example, while condensin I and II share the same pair of Smc proteins, the difference in the subunit composition specifies their spatiotemporal

dynamics and functional contributions to mitotic chromosome assembly (Hirota et al., 2004; Kong et al., 2020).

SMC function and dynamics on DNA requires additional auxiliary proteins (Baxter et al., 2019). More specifically, its loading on DNA and unloading of the DNA may depend on specific factors, at specific sites. For example, in Bacillus subtilis, the segregation ParB protein bound to parS site directly bind the Smc subunit; the ParB clamp presumably present DNA to the SMC complex to initiate DNA loop extrusion (Gruber and Errington, 2009; Sullivan et al., 2009; Wang et al., 2017a, 2015). Upon translocation, the site-specific recombinase XerD bound to its binding site unloads SMC complexes in the terminus region of the chromosome and this process is thought to involve specific interactions between the different components (Karaboja et al., 2021).

MukBEF was the first SMC complex identified. In *E. coli*, MukBEF is thought to be required for chromosome segregation as *muk* mutants present many anucleate cells or mis-segregated chromosomes (Niki et al., 1991). How MukBEF may promote chromosome segregation and organization has remained elusive for a long time and is still not clear (Nolivos and Sherratt, 2014). The effect of the MukBEF complex in *E. coli* appears to be radically different from that of SMC in *B. subtilis* or other bacteria. Instead of aligning the chromosome arms from a centromere-like locus, MukBEF promotes DNA contacts in the megabase range within each replication arm (Lioy et al., 2020a, 2018a). MukBEF promotes long range interactions along the chromosome except in the Ter region where MatP prevents its activity (Lioy et al., 2021, 2018a). Whether MukBEF is loaded at a particular locus is still an open question. The complete atomic structure of MukBEF in complex with MatP and DNA has been determined by electron cryomicroscopy (Bürmann et al., 2021); it contains also the MukBEF binding partner AcpP protein (Prince et al., 2021). It revealed that the complex binds two distinct DNA double helices reminiscent of the arms of an extruded loop, MatP-bound DNA threads through the MukBEF ring, while the second DNA is clamped by MukF, MukE, and the MukB ATPase heads. The presence of MatP in the complex together with its ability to prevent MukBEF activity prompted authors to propose that MatP might be an unloader of MukBEF (Bürmann et al., 2021).

Here we have performed a number of experiments using different *in vivo* approaches to further characterize how MukBEF contributes to chromosome management in E. coli. We have used ChIP-seq and Chromosome Conformation Capture (3C-seq and HiC) experiments to study how MukBEF is loaded on the chromosome and promotes long range DNA contacts. By using strains with various chromosome configurations obtained by programmed genetic rearrangements, we have explored how MukBEF activity proceeds along the chromosome and how MatP bound to matS sites prevents its activity. Our results together with comparative genomics analyses allow us to address the biological significance of

multiple *matS* sites in the Ter region of chromosomes in Enterobacteria and of the absence of MukBEF activity.

Results

MukBEF activity does not initiate at a single locus (initiates at multiple loci)

In order to characterize how MukBEF interacts with the chromosome and initiate its activity of long-range contacts, it was necessary to set-up a system to reveal using HiC the appearance and spread of long-range contacts along the chromosome upon MukBEF synthesis. The rationale was based on previous findings showing that long-range DNA contacts within replication arms, outside the Ter region, result from MukBEF activity. If MukBEF loads at a specific locus as observed for Smc-ScpAB at *parS* sites, we would expect to detect the appearance and spreading of long-range contacts from this site upon MukBEF synthesis. By contrast, if MukBEF loads stochastically or at multiple loci on the chromosome, long-range contacts should occur at multiple sites.

The analysis of MukBEF activity required an efficient system to control its activity. To conditionally express MukBEF, the *mukBEF* operon was cloned onto a medium-copy number plasmid under control of a *lacI* promoter and introduced in a *mukF* mutant. In the absence of inducer, as observed for a *mukF* mutant, no growth was detected at 37°C and the amount of anucleated cells at 22°C was similar to that of the *mukF* mutant (13% versus 15%). Induced expression of *mukBEF* functionally complemented the absence of MukF, restoring growth at 37°C in LB (Figure 1A) and accurately segregating the chromosome at 22°C, as evidenced by the low amount of anucleate cells (less than 2%) observed in the presence of the inducer (Figure 1B).

To determine how MukBEF activity initiate in the *E. coli* chromosome, we induced the expression of *mukBEF* and monitored the appearance of long-range DNA contacts at different times after induction. HiC contact maps were established 20 min, 40 min and 2 hours after induction and compared to that obtained in the absence of induction or in a wt strain (Figure 1C – supplementary figure 1C)): long-range DNA contacts were hardly visible after 20 min (supplementary Fig. 1A), were readily observed after 40 min and reached after 2 hours a level similar to that observed in wild-type strains (supplementary figure 1C). The ratio of normalized contact maps of the induced strain at different time points to the non-induced strain allowed to visualize the presence of long-range contacts all over the chromosome except in the Ter macrodomain (Figure 1D).

The range of DNA contacts along the chromosome was quantified by measuring the width of the diagonal perpendicular to it, using an adapted version of the quantification method developed by (Wang et al., 2017a (Lioy et al., 2020a);. The plot obtained (Fig. 1E) allows to estimate the effect of MukBEF activity on all loci of the *E. coli* genome. This confirmed the increase in the range of contacts following induction of MukBEF predicted from the ratio of normalized contact maps, with 40 minutes necessary to observe a significant effect and 2 hours to reach the maximum range of contact, as observed in the wild-type strain (Suplemetary Figure 1). As expected, the Ter region was not affected by the induction of MukBEF because of the presence of MatP bound to *matS* sites.

Altogether, the results indicate that the increase in contact does not originate from a specific position on the chromosome but rather appears from numerous sites, suggesting that the activity of MukBEF does not initiate at a single locus but rather from multiple loci along the chromosome.

MukBEF activity initiates in different regions of the E. coli genome

The MatP/matS system has been shown to prevent MukBEF activity in the Ter MD. We took advantage of this property to unravel mechanistic aspects of MukBEF activity and address the following issues: could MukBEF interacts with a region flanked by different Ter segments and could MukBEF operate from different regions of the chromosome. To answer these questions, we used bacteriophage λ site-specific recombination to perform large transpositions of a segment of the right ("RiTer") and left ("LiTer") replichore at different loci (supplementary figure 2A) (Thiel et al., 2012), in the Ter MDs, and analyze MukBEF activity in the resulting strain (Figure 2A).

The transposition in the RiTer configuration results in a region of 450kb devoid of *matS,* located between two Ter segments of 378 Kb and 437kb, which contain 11 *matS* and 17 *matS* respectively (supplementary figure2A). 3C-seq experiments were performed with this strain ("RiTer") and on the same strain deleted for *matP* or for *mukB* (Figure 2A-suplementary figure 2B). The ratio of normalized contact maps of the RiTer strain to the RiTer *ΔmatP* allowed to visualize the reduction of long-range contacts in the two Ter segments in the presence of MatP (Figure 2B). On the other hand, the ratio of normalized contact maps of the RiTer strain to the RiTer *ΔmukB* allowed to visualize the increase of long-range contacts outside the two Ter segments in the presence of MukBEF. Remarkably, long-range DNA contacts specific of MukBEF activity were observed over the chromosome except in the two Ter segments. The range of DNA contacts along the chromosome were quantified by measuring the width of the diagonal in the two strains; these plots (Figure 2C) allow to estimate the effect of MukBEF activity on all loci inside and outside Ter segments. These results indicated that MukBEF can operate to form

long-range contacts from a segment of a Right MD between the two Ter segments and that MatP can prevent MukBEF activity when segments carrying *matS* sites are moved in different locations of the genome.

Similar experiments were performed with a strain carrying a transposed segment from the Left replichore in the Ter MD (LiTer 15). In this configuration, a region of 1085 kb devoid of *matS,* is flanked by two Ter segments of 427 Kb and 374 kb containing 13 *matS* and 15 *matS* respectively (supplementary figure 2A). HiC experiments were performed on this strain ("LiTer") (Figure 2A). As observed with the RiTer strain, long-range DNA contacts specific of MukBEF activity were observed over the chromosome except in the two Ter segments. The ratio of normalized contact maps of the LiTer15 strain to the LiTer15 *ΔmukB* allowed to visualize the increase of long-range contacts outside the two Ter segments in the presence of MukBEF (Figure 2B and 2C- supplementary figure 2C).

Altogether, these results demonstrate that MukBEF activity can be initiated from multiple regions of the chromosome, in the Right, Left or Ori MDs, and that Ter segments cannot insulate DNA segments devoid of *matS* sites. They also reveal that MukBEF does not translocate from the Ori region to the terminus of the chromosome as observed with Smc-ScpAB in different bacteria. Furthermore, the results indicated that Ter segments carrying 17 and 11 *matS* can prevent MukBEF activity and restrict DNA contacts.

matS determinants to prevent MukBEF activity

The method described above, splitting the Ter region in two parts, revealed that two parts of Ter can prevent MukBEF activity. Thus, by varying the way Ter is spilt in two parts, one should be able to identify *matS* determinants required to affect MukBEF activity.

Two previous studies differ slightly in the prediction for the number and consensus sequence of *matS*. To clarify this, three independent ChIP-seq experiments were performed, revealing 28 *matS* and a newly derived consensus sequence (see supplementary Figure 3). To examine the requirements for the inhibition of MukBEF by MatP, a 1 Mb region of the left replichore was transposed at different positions into the TER domain, thus dividing Ter into two parts (referred to as Ter1 and Ter2, Ter1 comprising the *dif* site and the terminus of replication) of different size and carrying different number of *matS* (Figure 3A). Three transpositions were performed; generating Ter2 domains of 253, 209 and 136 kb containing 9, 7 or 4 *matS*, respectively (strains LiTer9, LiTer7, LiTer4). We used Hi-C to test the ability of these Ter2 regions to inhibit MukBEF (LiTer9 in supplementary Figure 4A, LiTer7 and LiTer4 in Figure 3B). Long-range DNA interactions were readily observed on both regions flanking Ter2 in both three strains, and long-range contacts are affected in the Ter2 segment, even when only 4 *matS* were

present (Figure 3B). Similar HiC experiments were performed with the same strains deleted for *matP* (Supplementary Figure 4B). The ratio of normalized contact maps of the LiTer4 strains to the corresponding *matP* derivatives (Figure 3C) clearly revealed that long-range contacts were limited in Ter 2 of the different strains. Remarkably, the 136 kb region carrying 4 *matS* sites in LiTer4 was sufficient to decrease long-range contacts promoted by MukBEF activity.

The ability of different Ter segments to inhibit the formation of long-range DNA contacts was quantified by measuring the range of contacts in the different Ter segments (Figure 3D and E). The median range of contact for the Ter segment $matS^{20}$-$matS^{28}$ in the WT condition is 263 +/- 24kb. Remarkably, no significant difference in the range of contacts (275 +/- 9kb) was observed in strain Liter9 for the Ter2 segment carrying 9 *matS*; it is noteworthy that this region carrying 9 *matS* sites shows the same range of contacts (280 +/- 35kb) in the wt configuration. This result shows that an independent 253-kb region carrying 9 *matS* prevent MukBEF activity as much as the same segment present in the 838-kb long Ter MD.

To further characterize how MatP/*matS* can prevent MukBEF activity, we measured the range of contacts in Ter2 segments carrying 7 or 4 *matS* sites. For the 209-kb segment carrying 7 *matS* sites, the range of contact was increased to 330 +/- 9kb while it increased to 352 +/- 12kb for the 136-kb segment with 4 *matS*. Values obtained for these segments when present as part of the WT Ter MD were slightly lower (Figure 3E). These results indicate that segments carrying 7 or 4 *matS* affect MukBEF activity even though at a lower level than a 250-kb segment with 9 *matS* sites.

The four *matS* sites present in the 136-kb Ter2 region of LiTer4 are not distributed regularly in that region (Figure 3A). We took advantage of this irregular spacing to test the capacity of a segment carrying 3 *matS* sites to prevent MukBEF activity and to explore whether the density of *matS* sites can modulate MukBEF activity. To address these two questions, we deleted either $matS^{26}$ or $matS^{28}$ from strain LiTer4 and probed using HiC the long-range of contacts. In strain LiTer4 D$matS^{26}$, three *matS* sites are distant from 78 and 58 kb whereas the *matS* sites in LiTer4 $\Delta matS^{28}$ strain are separated by 13 and 65 Kb. The ratio of normalized contact maps of the LiTer4 $\Delta matS^{26}$ or LiTer4 ΔmatS^{28} strains to the corresponding *matP* derivative (Figure 3B, 3C and Supplementary Figure 4C) revealed that long-range contacts were affected by the presence of only 3 *matS* sites in the 136-kb segment. By measuring the range of contacts in strains LiTer4 $\Delta matS^{26}$ and LiTer4 $\Delta matS^{28}$ (Figure 3E), the density of three *matS* sites provided by matS25-matS26 and matS27 in strain LiTer4 $\Delta matS^{28}$ seems to be as efficient (range contact of 357 kb +/- 11 kb) as the four *matS* sites in strain LiTer4 (range contact of 352 +/- 12kb). In contrast, in LiTer4 $\Delta matS^{28}$, the range of contact is increased to 370 kb +/- 6 kb indicating a reduced ability to prevent MukBEF activity. Altogether, these results suggested that the density of

matS sites in a small chromosomal region has a greater impact than dispersion of the same number of *matS* sites over a larger segment.

MukBEF preferentially binds in newly replicated regions

Results presented above indicated that MukBEF activity can be initiated from multiple regions of the chromosome and that, unlike Smc-ScpAB, MukBEF does not translocate from the Ori region to the terminus of the chromosome. To further characterize the loading and translocation process of MukBEF, we performed ChIP-seq experiments using a FLAG version of MukB on synchronized cells using a *dnaC2* thermosensitive allele that allows to control the timing of replication initiation (Figure 4A). The cells were grown at a permissive temperature, then shifted to 40°C for 2 hours to allow the ongoing round of replication to complete without being able to initiate a new round; the cells were then shifted back to 30°C and samples were taken for ChIP-seq analyses after 10, 20 and 40 minutes. At t0, there is no variation in the number of sequences along the chromosome indicating the absence of replication. In this condition, the ChIP-seq signals show a slight enrichment of signals outside the Ter region. After 10 minutes at the permissive temperature, a fraction of >500 kb centered on *oriC* was replicated as revealed by an increase of sequencing reads in this region. After 20 minutes, a large zone of over 1.4 Mb was replicated, and after 40 minutes, the chromosome was fully replicated and the replication profile was similar to that of non-synchronized cells because of new replication cycles initiated. Normalized ChIP-seq experiments were performed by normalizing the quantity of immuno-precipitated fragments to the input of MukB-Flag and then divide by the normalized ChiP signals at t0 to measure the enrichment trigger by replication. This experiment showed a 2- to 4-fold enrichment in the regions that have been replicated (Figure 4A). After 10 min, the signal was increased over 500 kb on each side of oriC. At 20 min, the signal progressed and corresponded to the regions that have been replicated. At 40 min, when the chromosome has been fully replicated, the signals obtained in the ChIP-seq samples indicated an enrichment of MukBEF all along the chromosome except in a 1.5 Mb region centered on the Ter region. As shown in Figure 4B, superimposition of input and ChIP-seq profiles indicated that MukBEF enrichment drops to background levels 250kb before the Ter domain. This enrichment followed the progression of replication and spread from *oriC* towards the Ter. Altogether, these results suggest that MukBEF is loaded in newly replicated regions, progressively behind the replication process, except in the Ter region from which it would be excluded.

Ter segments prevent MukBEF binding

To further explore the ability of MatP to exclude MukBEF from the Ter region, we tested the ability of MatP to exclude MukBEF from chromosomal regions containing *matS* sequences. Chip-Seq experiments were performed on the Liter7 strain, which has a Ter segment closer to oriC. As in the wild-type background, MukBEF is preferentially associated with newly replicated sequences and shows a 3-fold increase following replication fork progression. However, a break in this enrichment profile is detected in the sequence corresponding to Ter2 (Figure 4C). These results suggest that MukBEF does not bind or persist in segments carrying *matS* sites, and that the MatP/*matS* system prevent residence of MukBEF in that region.

Long-range contacts correlate with MukBEF binding

Since MukBEF was shown to bind preferentially in newly replicated regions, we wanted to test if a preferential activity of MukBEF was detectable in those regions. To do this, we performed Hi-C on non-replicating cells lacking MukF, and induced MukBEF expression with or without restarting replication. In the absence of replication and of MukBEF, long-range contacts were constrained by barriers that delimit domains, called Chromosome-Interacting Domains (CIDs), previously detected in WT cells in growing conditions (supplementary Figure 5). Remarkably, after two hours of MukBEF induction in non-replicating cells, long-range contacts were detected except in the Ter region, indicating that MukBEF activity does not require newly replicated DNA to promote long-range contacts (Figure 4D). Finally, restarting replication for 40 minutes after 2 hours of MukBEF induction did not alter significantly the range and distribution of long-range DNA contacts observed in the absence of replication but in the presence of MukBEF. Altogether, these results indicate that MukBEF promotes long-range DNA contacts in a similar way independently of the replication process even though it binds preferentially in newly replicated regions.

Functional implications, comparative genomics and model

In *E. coli*, there are 28 *matS* sequences dispersed throughout the 1.03 MB Ter domain. The average *matS* density is 3 *matS* per 100 Kb, but this distribution is not uniform and the *matS* density doubles in the vicinity of the *dif* sequence (supplementary Figure 6A). Despite the fact that only 9 *matS* are sufficient to completely inhibit MukBEF activity, *matS* sites have been selected to ensure that a large portion of the *E. coli* chromosome is inaccessible to MukBEF.

To determine if other species also possess a large Ter domain, we used the *matS* consensus sequence to identify the Ter domain in 16 bacteria from the enterobacterals, pasteurellales, and vibrionales groups with the higher number of sequenced genomes. The Ter domain was defined as the longest stretch of *matS* sequences between areas that are at least 100 KB devoid of *matS*. The size of the Ter domain varies from 300 KB to 1 MB, representing 6 to 25% of the chromosome, and contains 6 to 77 *matS* (Table 1). In most of these species, more than 14 *matS* sequences are distributed over 540 KB, and the Ter domain always contains the dif sequence. To test if the *matS* distribution might differ in the vicinity of the *dif* sequence, we measured the *matS* density and centered the distribution on the *dif* sequence. As shown in Figure 5, the number of *matS* per kb increases for all species and reaches its maximum near the *dif* site.

Discussion

SMC complexes play a fundamental role in the organization of genomes in all domains of life. Different models involving their loading, translocation or extrusion of DNA loops as well as their unloading have been proposed, based on results obtained with different complexes and in different models. Among the SMC complexes, MukBEF has specific features: MukBEF is only found in enterobacteria and some related bacterial genera where it is involved in chromosome segregation; the mukBEF genes belong to a group of genes co-occurring with the Dam methylase gene including also matP and other genes involved in DNA metabolism; MukBEF exists as dimers of dimers connected by the kleisin subunit MukF; by its activity, MukBEF does not align the two arms of the chromosome like the canonical bacterial Smc-ScpAB complex but instead promotes long distance contacts in cis like a eukaryotic condensin. Remarkably, MukBEF activity is not detected within the specific chromosomal Ter domain, one-fifth of the *E. coli* chromosome, due to the presence of MatP associated with this region. Although details about MukBEF and its activity have been revealed in recent years, key steps in its function remain to be characterized, including loading onto the DNA molecule, its actual loop extrusion activity, and its unloading by MatP.

Altogether, our data provide an integrated view of MukBEF activity to organize the E. coli chromosome. By different ChIP-seq and HiC approaches performed in different strains, some of which have undergone programmed genetic rearrangements, we showed that MukBEF loading does not only involve the Ori region but also different regions of the chromosome. Our results also indicated that although MukBEF binds preferentially in newly replicated regions, its activity is detected even in the

absence of replication and long-range contacts appear similarly throughout the genome, except in the Ter region. These results support a model in which MukBEF molecules are bound to the chromosome, molecules are removed or displaced by replication, MukBEF molecules readily reassociate in newly replicated regions except in Ter region in which the unloading of MukBEF is enhanced by MatP bound to *matS* sites. These results unveiled that fluorescent MukBEF foci previously observed associated with the Ori region were probably not bound to DNA (Nicolas et al., 2014). Instead, our results further support the previous proposal that MukBEF may organize a series of loops around a thin MukBEF axial core. Altogether, our results reveal a striking contrast with the way Smc-ScpAB loads on DNA by interacting with the ParB at *parS* sites and then translocates towards the ter region. Instead, long-distance contacts promoted by MukBEF did not occur as a wave from a specific region but rather initiate at different positions, in different regions of the genome. Thus the activity of MukBEF appears to be more similar to that of eukaryotic condensins than to that of the Smc-ScpAB complex.

Our results showed that MukBEF was not detected in regions containing *matS* sites and that these regions were devoid of contacts extending over 600 kb. By varying the number of *matS* sites at an ectopic position, we showed that MukBEF inhibition is graded with the number of *matS*; while an effect is already visible with 3 matS scattered over a 78 kb region, the maximal effect seems to be reached with 9 *matS* sites distributed over a 253 kb region. As proposed for Smc-ScpAB and its unloading XDS site, if the movement of DNA in the loop extrusion process involves large steps, it is conceivable that several *matS* sites are required for a complex to be trapped and discharged by MatP bound to a *matS* site. Accordingly, the density of *matS* sites seems to affect the inhibition efficiency supporting this assumption. Further exeriments will be needed to analyze in details the optimal spacing of matS sites to inhibit MukBEF activity.

The structure of the MukBEF-AcpP-MatP/matS complex obtained by cryoEM revealed the entrapment of two topologically separated DNA segments in two distinct compartments called “ring” and “clamp”, with the *matS* site present in the ring compartment. The proposed model for MukBEF unloading stipulates that the unloading of the segment carrying *matS* site in the ring compartment is coupled to the unloading of the other segment in the clamp. One of the MatP monomers forms a contact with one of the MukE monomers while the joint binds and positions MatP between the MukB arms. The joint interface is much larger than the MukE-MatP bridge and likely provides the major binding energy for association (Bürmann et al., 2021). Indeed, a change to alanine of the five residues between H38 and D42 in contact with MukE did not affect MatP’s ability to inhibit MukBEF activity (supplementary figure 7). Refined experiments will be required to assess the outcome of mutating MatP residues

involved in the interaction with the joint as mutations of those residues also affect *matS* binding (Dupaigne et al., 2012).

MukBEF activity is detected by the appearance of contacts at a distance close to the megabase and such contacts appear on about 4 Mb. Even if the molecular details of this activity remain to be characterized, it is tempting to speculate that MukBEF molecules can be discharged from DNA in the absence of MatP, i.e. outside the Ter region. Furthemore, it can be noted that MukBEF activity does not appear to be significantly disrupted in a *matP* mutant suggesting that MukBEF can be discharged from DNA in the absence of MatP. As proposed by (Bürmann et al., 2021), MatP would act as a structural element that ensures ideal positioning of DNA close to the exit gate in the MukBEF complex that might ensure an efficient unloading of MukBEF from the DNA. Altogether, the results would indicate that MatP is not the MukBEF unloader per se, but rather that its ability to prevent MukBEF activity has been selected to protect the Ter region from a condensin activity.

The distribution of *matS* sites over a large region of the chromosome in enterobacteria results in the inhibition of MukBEF in ter. MatP has already been shown to confer another property to ter, through an interaction of its C-terminus with the septum-associated protein ZapB and localizing ter at midcell. Remarkably, these two properties are independent as inhibiting MukBEF does not require its anchoring of ter at the septum of division. Given that the number of *matS* sites far exceeds the number required to prevent MukBEF activity and that the density of *matS* sites increases as we approach dif, we may speculate that MukBEF presence is mostly banished from the *dif* region. Two activities of DNA metabolism occur at this locus: resolution of chromosome dimers by XerC-XerD recombinases and the post-replicative decatenation of circular chromosomes. A major challenge for the future is to define whether and how MukBEF may interfere with one or both of these processes.

In the absence of replication and of condensin, the contact map displayed a single strong diagonal composed of very well-defined CIDs (for Chromosomal Interacting Domains), ranging in size from 20 to 400 kb. The CIDs clearly visible in populations of cells growing exponentially were prominent in these conditions revealing the impact of transcription on the structuring of the genome. Upon replication, the CID organization is less apparent because of the new contacts that occur between loci belonging to different CIDs. The induction of MukBEF in the presence of replication further attenuates the patterning of CIDs. Altogether, these results highlight the respective contribution of these three processes, transcription, replication and condensin activity, on the organization of bacterial genomes.

Materials and methods

Bacterial strains and plasmids

All *E. coli* strains used in this study are derived from *E. coli* MG1655. Deletion mutants were constructed as described in **(Datsenko and Wanner, 2000)**. Mutations were combined via P1 transduction. A plasmid capable of synthesizing MukBEF was constructed by cloning the entire *mukBEF* operon into the ppSV38 plasmid using *Eco*RI/*Xba*I.

Media and growth conditions

E. coli cells were cultured at 22°C and 30°C in either Lennox Broth (LB) or liquid minimal medium A (MM) supplemented with 0.12% casamino acids and 0.4% glucose. When necessary, antibiotics were added to the growth media at the following concentrations: ampicillin (Amp) at 100 µg/mL, kanamycin (Kan) at 50 µg/mL, chloramphenicol (Cm) at 15 µg/mL, spectinomycin (Sp) at 50 µg/mL, apramycin (Apra) at 50 µg/mL, and zeocin (Zeo) at 25 µg/mL

3C-seq protocol

3C-seq librairies were generated as described (Lioy et al., 2018b). Briefly 100ml of culture were crosslinked with formaldehyde (7% final concentration) for 30 min at room temperature (RT) followed by 30 min at 4°C. Formaldehyde was quenched with a final concentration of 0.25 M glycine for 20 min at 4°C. Fixed cells were collected by centrifugation and stored at −80°C until use. Frozen pellets

consisting of approximately 1-2 x 10^9 cells were thawed and suspended in 600 µl of TE buffer (10 mM Tris-HCl, 0.5 mM EDTA, pH 8) with 4 µl of lyzozyme (35 U/µl). The mixture was incubated at room temperature for 20 minutes. Subsequently, SDS was added to a final concentration of 0.5% and the cells were incubated for an additional 10 minutes at room temperature. 50 µl of lysed cells were then transferred to a tube containing 450 µl of digestion mix (1X NEB 1 buffer, 1% Triton X-100). This process was repeated 11 times, resulting in a total of 12 tubes containing 500 µl each. 100 units of *Hpa*II were added to 10 tubes and the tubes were incubated for 2 hours at 37°C. To halt the digestion reaction, 8 tubes were immediately centrifuged for 20 minutes at 20,000 g, and the pellets were suspended in 500 µl of sterile water. The resulting digested DNA (4 ml in total) was divided into four aliquots and diluted in 8 ml of ligation buffer (1X ligation buffer NEB without ATP, 1 mM ATP, 0.1 mg/mL BSA, 125 units of T4 DNA ligase, 5 U/µl). Ligation was performed at 16°C for 4 hours, followed by overnight incubation at 65°C with 100 µl of proteinase K (20 mg/ml) and 100 µl EDTA 500 mM. DNA was then precipitated with an equal volume of 3 M Na-Acetate (pH 5.2) and two volumes of iso-propanol. After 1 hour at -80°C, the DNA was pelleted and suspended in 500 µl of 1X TE buffer. The final 4 tubes (two with *Hpa*II and two without restriction enzyme) were incubated directly with 50 µl of proteinase K (20 mg/mL) for an overnight period at 65°C. Subsequently, all tubes were transferred to 2 ml centrifuge tubes and extracted twice with 400 µl of phenol-chloroform pH 8.0. The DNA was then precipitated, washed with 1 ml of 70% cold ethanol, and resuspend in 30 µl of 1X TE buffer in the presence of RNase A (1 µg/ml). The tubes containing ligated DNA (3C libraries), digested DNA, and non-digested DNA were pooled into three separate tubes. The efficiency of the 3C preparation was evaluated by running a 1% agarose gel.

Hi-C protocol

Hi-C librairies were generated as described (Thierry and Cockram, 2022).

10^8 cells growing in the exponential growth phase of *E. coli* were chemically crosslinked by the addition of formaldehyde directly to the cultures (3% final concentration) for 30 min at room temperature with

gentle agitation. Crosslinking was quenched by the addition of glycine (0.5 M final concentration) for 20 min at room temperature. Celle were wash in 50 ml PBS 1X and centrifuged. The pellet was resuspended in 1 ml 1 x PBS and transferred to a 1.5 ml Eppendorf tube before a final centrifugation step (4000 x g, 5 min, room temperature), the supernatant was then removed and the pellet stored at −80°C. The pellet was then resuspended in 1 ml of 1x TE + complete protease inhibitor cocktail (EDTA-free, Sigma Aldrich) and transferred to a 2 ml Eppendorf tube with 4 µl of Ready to lyse Lysozyme for 20mn at room temperature. SDS was added to a final concentration of 0.5% and the cells were incubated for an additional 10 minutes. In a 10 ml Falcon tube, DNA was then prepared for digestion by the addition of 3 ml H2O, 500 µl 10X Digestion buffer (200 mM Tris-HCl pH 7.5, 100 mM MgCl2, 10 mM DTT, 1 mg/ml BSA) and 500 µl 10% Triton X-100 (Thermo-Fisher). After thoroughly mixing the reaction, 400 µl were removed and transferred to a 1.5 ml Eppendorf tube as a non-digested (ND) control. The restriction enzyme *Hpa*II (New England Biolabs, 1000 U) was then added to the remaining sample and the tube incubated with gentle agitation for 3h at 37°C. The solution was centrifuged (16,000 x g, 20 min, room temperature. After removing the supernatant, the pellet was resuspended in 400 µl H_2O, completed subsequently by adding 50 µl 10x Ligation Buffer (500 mM Tris-HCl pH 7.5, 100 mM $MgCl_2$, 100 mM DTT), 4.5 µl 10 mM dAGTTp, 37.5 µl Biotin-14-dCTP (Thermo Fisher), 50 Units of DNA Polymerase I - Large Klenow Fragment (New England Biolabs). After briefly mixing, the reaction was incubated with agitation for 45 min at 37°C. The ligation was set up by adding the following; 120µl 10x Ligation Buffer, 12 µl 10 mg/ml BSA, 12 µl 100mM ATP, 540 µl H_2O, 480 U T4 DNA ligase (Thermo Fisher). The reaction was mixed gently and then incubated with gentle agitation for 3h at room temperature. Following ligation, proteins were denatured by the addition of 20 µl 500 mM EDTA, 20 µl 10% SDS, and 100 µl 20 mg/ml proteinase K (EuroBio). The following day, DNA was purified using the standard procedure describe for the 3C-seq.

Chip-seq protocol

10^9 cells in the exponential growth phase of E. coli were chemically crosslinked by adding formaldehyde directly to the cultures (final concentration of 1%) for 30 minutes at room temperature with gentle agitation. Crosslinking was quenched by adding glycine (final concentration of 0.25 M) for 15 minutes at room temperature. The cells were washed twice with 1X TBS (50mM Tris-Hcl ph 7.6, 0.15M NaCl) and the pellet was resuspended in 1 mL of 1X TBS before a final centrifugation step (4000 x g, 5 minutes, room temperature). The supernatant was then removed and the pellet was stored at -80°C.

The pellet was resuspended in 500 µl of lysis buffer 1 (20% sucrose, 10 mM Tris pH 8, 50 mM NaCl, 10 mM EDTA) and 4 µl of ready-to-lyse lysozyme was added, followed by incubation at 37°C for 30 minutes. Then, 500 µl of lysis buffer 2 (50 mM Tris-HCl pH 4.7, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% Triton X100) and a tablet of antiprotease cocktail (Roche) were added. The solution was transferred to a 1 mL Covaris tube and sonicated for 10 minutes (peak incident power 140 W/duty cycle 5%/cycle per burst 200). Cell debris were eliminated by centrifugation at 13,000 rpm for 30 minutes at 4°C. The supernatant was transferred to a fresh Eppendorf tube and 50 µl was used as input. The rest of the cell extract was mixed with 40 µl of anti-FLAG M2 resin previously washed in TBS and resuspended in lysis buffer 2. The solution was incubated overnight at 4°C with gentle mixing and then centrifuged for 30 seconds at 5,000 g. The pellet was washed twice with TBS containing 0.05% Tween 20 and three times with TBS.

To elute the immunoprecipitation, 100 µl of 1X TBS containing 15 µg of 3X FLAG peptide was mixed with the resin and incubated for 30 minutes at 4°C. Then, the solution was centrifuged for 30 seconds at 5,000 g and the supernatant was transferred to a new tube. A second elution step was performed on the resin before decrosslinking.

IP and input was purified using MinElute Qiagen columns and then sequenced.

Processing of libraries for Illumina sequencing

The samples were sonicated using a Covaris S220 instrument to obtain fragments ranging in size from 300 to 500 base pairs. These fragments were then purified using AMPure XP beads. The Illumina sequencing process was performed in accordance with the manufacturer's recommendations, with 15 cycles of amplification. The size of the DNA fragments in the libraries was assessed using TAE 1% agarose gel and tape station, followed by paired-end sequencing on an Illumina sequencer.

Generation of contact maps

Contact maps were constructed as described previously (Lioy et al., 2018b). Briefly, each read was assigned to a restriction fragment. Non-informative events such as self-circularized restriction fragments, or uncut co-linear restriction fragments were discarded, as in (Cournac et al., 2012). The genome was then divided into 5 kb units, and the corresponding contact map was generated and normalized through the sequential component normalization procedure of *SCN* (based on the sequential component normalization; https://github.com/koszullab/E_coli_analysis) (Lioy et al., 2018b). Contact maps were visualized as logarithmic matrices to aid in visualization.

Ratio of contact maps

The comparison of contact maps was facilitated by displaying their ratio. The ratio was calculated for each point on the map by dividing the number of contacts in one condition by the number of contacts in the other condition. The Log2 of the ratio was then plotted using a Gaussian filter. The color code represented a decrease or increase in contacts in one condition relative to the other (a blue or red signal, respectively); a white signal indicated no change.

Quantification of the range of *cis* contacts along the chromosome

We used a three-step process adapted from (Lioy et al., 2020b) and (Wang et al., 2017b) to determine the width of the diagonal in contact maps. To improve the resolution of the Ter limit, we measured the width perpendicularly to the main diagonal.

First, we calculated the median of the contact map and estimated the standard deviation (σ) using a robust statistic, where σ = 1.4826 * mad (mad = median absolute deviation). Next, we used a point connecting algorithm to differentiate significant interactions from background noise. The size of each connected element identified by the "bwlabel" function of MATLAB was determined. We considered a connected element with a size greater than or equal to 30 points to be significant and used the "imclose()" function of MATLAB to fill in the empty points within the connected elements using a diamond shape with a size of 5.

Subsequently, we calculated the width of the primary diagonal for each 5-kb bin of the genome. The range of cis contact was estimated from the width of the primary diagonal by multiplying the number of measured bins by the bin size (5 kb) and dividing by two (since the range is symmetric on both sides of the chromosomal locus being considered). Finally, a boxplot was used to visualize the entire range of *cis* contacts for all the analyzed chromosome regions.

Directional Index analysis

Directional Index was calculate as described in (Lioy et al., 2018b). The directional index is a statistical metric that quantifies the level of upstream or downstream contact bias for a given genomic region (Dixon et al., 2012). This metric is based on a t-test comparison of contact vectors to the left and right of each bin, up to a certain scale. The boundaries between topological domains often generate fluctuating signals that result in a transition in the directional preference. Specifically, for each 5 kb bin, we extracted the contact vector from the correlation matrix between that bin and neighboring bins at regular 5 kb intervals, up to 100 kb, in both left and right directions. At each step, the paired t-test was used to determine whether the strength of interactions was significantly stronger in one

direction relative to the other. A threshold of 0.05 was used to assess statistical significance. The directional preferences for each bin along the chromosome were visualized as a bar plot, with positive and negative t-values shown as red and green bars, respectively. To improve the clarity of presentation, bars for bins with t-values below -2 or above 2 (corresponding to a p-value of 0.05) were truncated. Between two identified domains in the contact matrices, the directional preference of bins changed, which was indicated by alternating red and green colors.

References

Anchimiuk, A., Lioy, V.S., Bock, F.P., Minnen, A., Boccard, F., Gruber, S., 2021. A low Smc flux avoids collisions and facilitates chromosome organization in Bacillus subtilis. Elife 10, e65467.

Badrinarayanan, A., Reyes-Lamothe, R., Uphoff, S., Leake, M.C., Sherratt, D.J., 2012. In vivo architecture and action of bacterial structural maintenance of chromosome proteins. Science 338, 528–531.

Baxter, J., Oliver, A.W., Schalbetter, S.A., 2019. Are SMC Complexes Loop Extruding Factors? Linking Theory With Fact. BioEssays 41, 1800182. https://doi.org/10.1002/bies.201800182

Brandão, H.B., Ren, Z., Karaboja, X., Mirny, L.A., Wang, X., 2021. DNA-loop-extruding SMC complexes can traverse one another in vivo. Nature structural & molecular biology 28, 642–651.

Bürmann, F., Funke, L.F., Chin, J.W., Löwe, J., 2021. Cryo-EM structure of MukBEF reveals DNA loop entrapment at chromosomal unloading sites. Molecular cell 81, 4891-4906. e8.

Bürmann, F., Lee, B.-G., Than, T., Sinn, L., O'Reilly, F.J., Yatskevich, S., Rappsilber, J., Hu, B., Nasmyth, K., Löwe, J., 2019. A folded conformation of MukBEF and cohesin. Nature structural & molecular biology 26, 227–236.

Cobbe, N., Heck, M.M., 2004. The evolution of SMC proteins: phylogenetic analysis and structural implications. Molecular biology and evolution 21, 332–347.

Cournac, A., Marie-Nelly, H., Marbouty, M., Koszul, R., Mozziconacci, J., 2012. Normalization of a chromosomal contact map. BMC Genomics 13, 436. https://doi.org/10.1186/1471-2164-13-436

Datsenko, K.A., Wanner, B.L., 2000. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 97, 6640–6645. https://doi.org/10.1073/pnas.120163297

Davidson, I.F., Bauer, B., Goetz, D., Tang, W., Wutz, G., Peters, J.-M., 2019. DNA loop extrusion by human cohesin. Science 366, 1338–1345.

Dixon, J.R., Selvaraj, S., Yue, F., Kim, A., Li, Y., Shen, Y., Hu, M., Liu, J.S., Ren, B., 2012. Topological domains in mammalian genomes identified by analysis of chromatin interactions. Nature 485, 376–380. https://doi.org/10.1038/nature11082

Dupaigne, P., Tonthat, N.K., Espéli, O., Whitfill, T., Boccard, F., Schumacher, M.A., 2012. Molecular basis for a protein-mediated DNA-bridging mechanism that functions in condensation of the E. coli chromosome. Molecular cell 48, 560–571.

Ganji, M., Shaltiel, I.A., Bisht, S., Kim, E., Kalichava, A., Haering, C.H., Dekker, C., 2018. Real-time imaging of DNA loop extrusion by condensin. Science 360, 102–105.

Gruber, S., Errington, J., 2009. Recruitment of Condensin to Replication Origin Regions by ParB/SpoOJ Promotes Chromosome Segregation in B. subtilis. Cell 137, 685–696. https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.02.035

Hassler, M., Shaltiel, I.A., Haering, C.H., 2018. Towards a unified model of SMC complex function. Current Biology 28, R1266–R1281.

Hirota, T., Gerlich, D., Koch, B., Ellenberg, J., Peters, J.-M., 2004. Distinct functions of condensin I and II in mitotic chromosome assembly. Journal of cell science 117, 6435–6445.

Karaboja, X., Ren, Z., Brandão, H.B., Paul, P., Rudner, D.Z., Wang, X., 2021. XerD unloads bacterial SMC complexes at the replication terminus. Molecular Cell 81, 756-766.e8. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2020.12.027

Kong, M., Cutts, E.E., Pan, D., Beuron, F., Kaliyappan, T., Xue, C., Morris, E.P., Musacchio, A., Vannini, A., Greene, E.C., 2020. Human condensin I and II drive extensive ATP-dependent compaction of nucleosome-bound DNA. Molecular cell 79, 99-114. e9.

Lioy, V.S., Cournac, A., Marbouty, M., Duigou, S., Mozziconacci, J., Espéli, O., Boccard, F., Koszul, R., 2018a. Multiscale structuring of the E. coli chromosome by nucleoid-associated and condensin proteins. Cell 172, 771-783. e18.

Lioy, V.S., Cournac, A., Marbouty, M., Duigou, S., Mozziconacci, J., Espéli, O., Boccard, F., Koszul, R., 2018b. Multiscale Structuring of the E. coli Chromosome by Nucleoid-Associated and Condensin Proteins. Cell 172, 771-783.e18. https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.12.027

Lioy, V.S., Junier, I., Boccard, F., 2021. Multiscale dynamic structuring of bacterial chromosomes. Annual review of microbiology 75, 541–561.

Lioy, V.S., Junier, I., Lagage, V., Vallet, I., Boccard, F., 2020a. Distinct activities of bacterial condensins for chromosome management in Pseudomonas aeruginosa. Cell reports 33, 108344.

Lioy, V.S., Junier, I., Lagage, V., Vallet, I., Boccard, F., 2020b. Distinct Activities of Bacterial Condensins for Chromosome Management in Pseudomonas aeruginosa. Cell Reports 33, 108344. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.108344

Marbouty, M., Le Gall, A., Cattoni, D.I., Cournac, A., Koh, A., Fiche, J.-B., Mozziconacci, J., Murray, H., Koszul, R., Nollmann, M., 2015. Condensin-and replication-mediated bacterial chromosome folding and origin condensation revealed by Hi-C and super-resolution imaging. Molecular cell 59, 588–602.

Nicolas, E., Upton, A.L., Uphoff, S., Henry, O., Badrinarayanan, A., Sherratt, D., 2014. The SMC complex MukBEF recruits topoisomerase IV to the origin of replication region in live Escherichia coli. MBio 5, e01001-13.

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. The EMBO journal 10, 183–193.

Nolivos, S., Sherratt, D., 2014. The bacterial chromosome: architecture and action of bacterial SMC and SMC-like complexes. FEMS microbiology reviews 38, 380–392.

Pradhan, B., Barth, R., Kim, E., Davidson, I.F., Bauer, B., van Laar, T., Yang, W., Ryu, J.-K., van der Torre, J., Peters, J.-M., 2022. SMC complexes can traverse physical roadblocks bigger than their ring size. Cell Reports 41, 111491.

Prince, J.P., Bolla, J.R., Fisher, G.L., Mäkelä, J., Fournier, M., Robinson, C.V., Arciszewska, L.K., Sherratt, D.J., 2021. Acyl carrier protein promotes MukBEF action in Escherichia coli chromosome organization-segregation. Nature communications 12, 1–12.

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

Thiel, A., Valens, M., Vallet-Gely, I., Espéli, O., Boccard, F., 2012. Long-range chromosome organization in E. coli: a site-specific system isolates the Ter macrodomain. PLoS genetics 8, e1002672.

Thierry, A., Cockram, C., 2022. Generating High-Resolution Hi-C Contact Maps of Bacteria, in: Bicciato, S., Ferrari, F. (Eds.), Hi-C Data Analysis, Methods in Molecular Biology. Springer US, New York, NY, pp. 183–195. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1390-0_9

Wang, X., Brandão, H.B., Le, T.B., Laub, M.T., Rudner, D.Z., 2017a. Bacillus subtilis SMC complexes juxtapose chromosome arms as they travel from origin to terminus. Science 355, 524–527.

Wang, X., Brandão, H.B., Le, T.B.K., Laub, M.T., Rudner, D.Z., 2017b. *Bacillus subtilis* SMC complexes juxtapose chromosome arms as they travel from origin to terminus. Science 355, 524–527. https://doi.org/10.1126/science.aai8982

Wang, X., Le, T.B., Lajoie, B.R., Dekker, J., Laub, M.T., Rudner, D.Z., 2015. Condensin promotes the juxtaposition of DNA flanking its loading site in Bacillus subtilis. Genes & development 29, 1661–1675.

Yatskevich, S., Rhodes, J., Nasmyth, K., 2019. Organization of chromosomal DNA by SMC complexes. Annual review of genetics 53, 445–482.

Yoshinaga, M., Inagaki, Y., 2021. Ubiquity and origins of structural maintenance of chromosomes (SMC) proteins in eukaryotes. Genome Biology and Evolution 13, evab256.

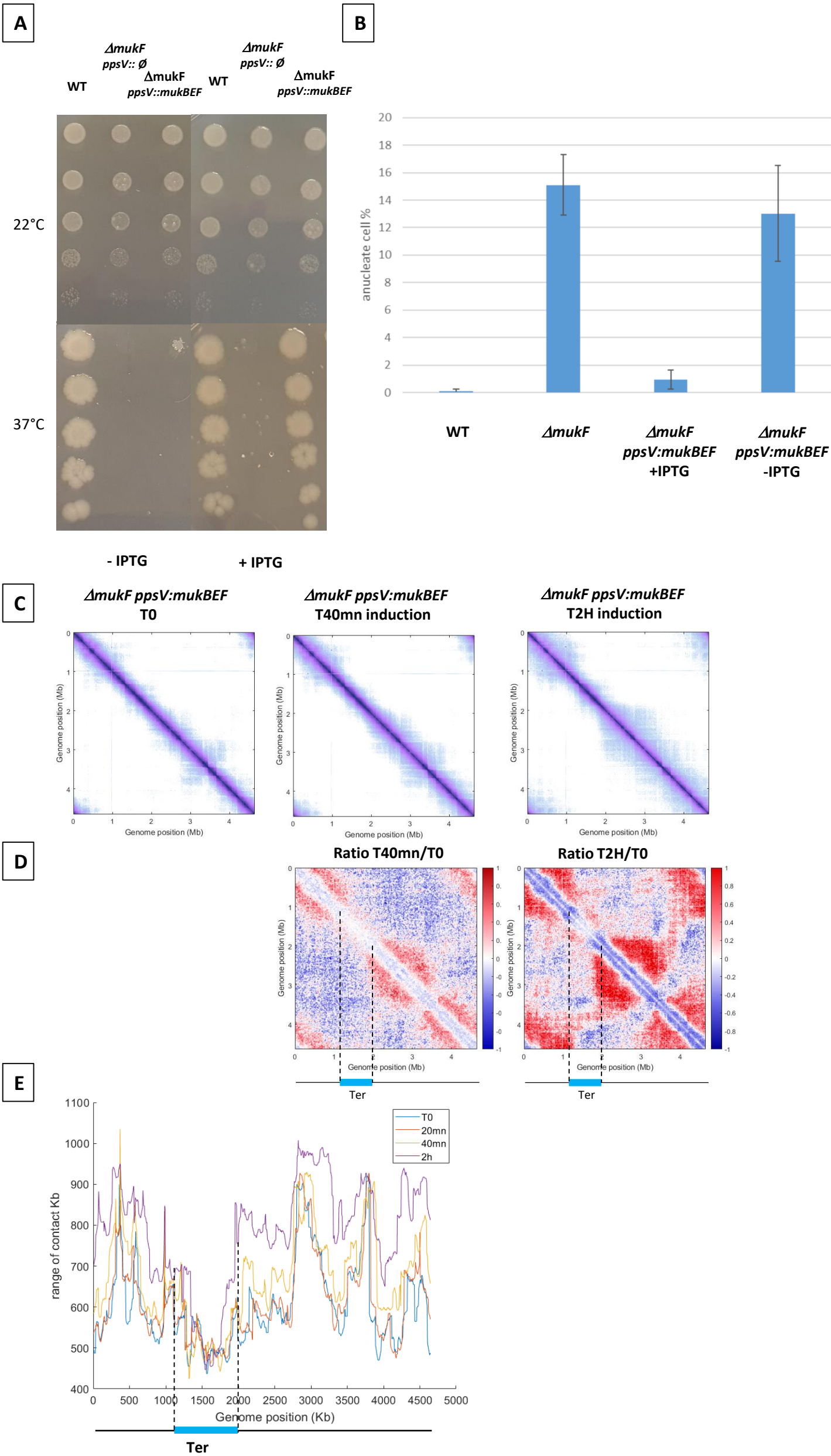
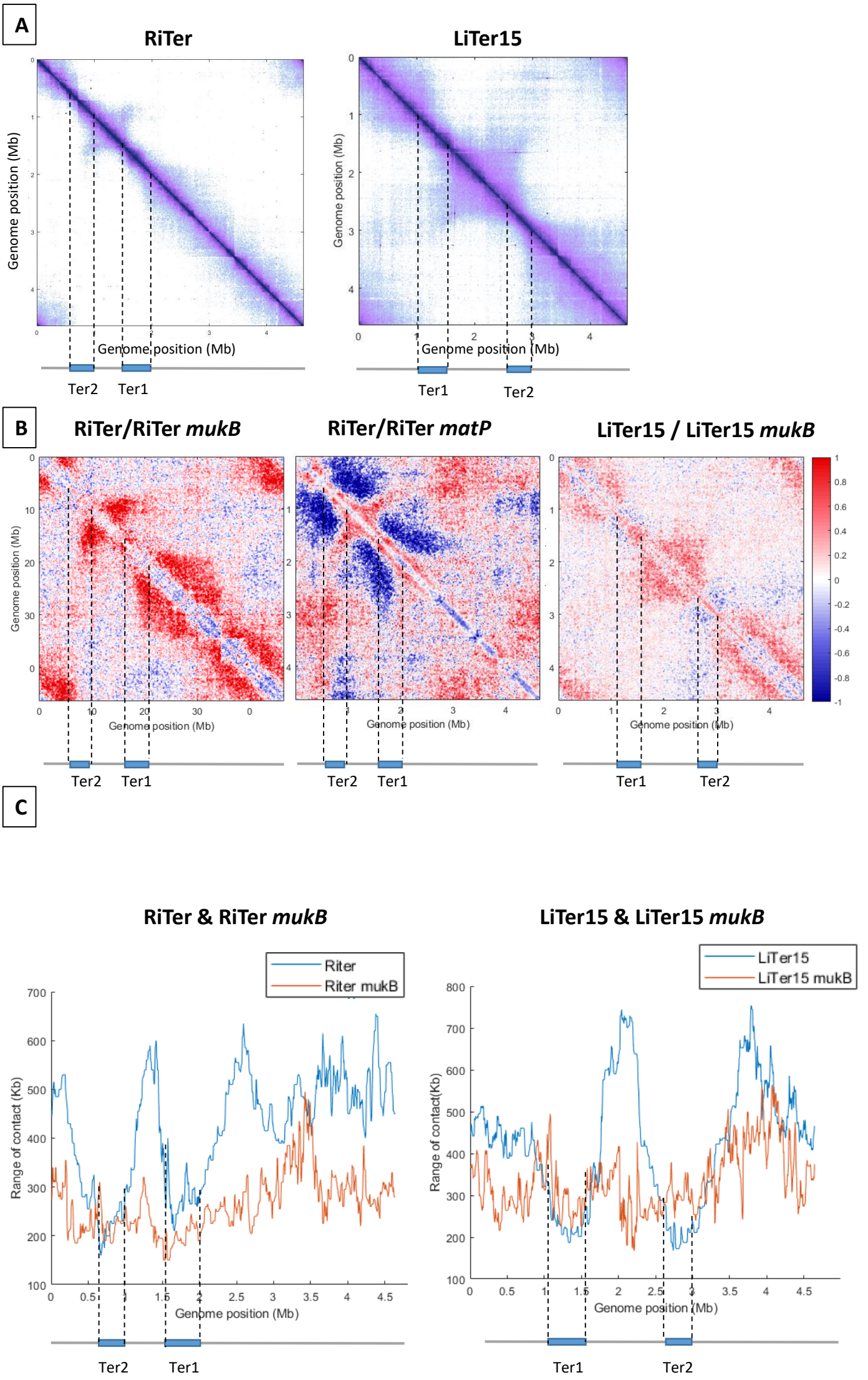

A
WT
ΔmukF ppsV:: Ø
ΔmukF ppsV::mukBEF
WT
ΔmukF ppsV:: Ø
ΔmukF ppsV::mukBEF
22°C
37°C
- IPTG
+ IPTG
B
anucleate cell %
WT
ΔmukF
ΔmukF ppsV:mukBEF +IPTG
ΔmukF ppsV:mukBEF -IPTG
C
ΔmukF ppsV:mukBEF T0
ΔmukF ppsV:mukBEF T40mn induction
ΔmukF ppsV:mukBEF T2H induction
Genome position (Mb)
D
Ratio T40mn/T0
Ratio T2H/T0
Ter
E
range of contact Kb
T0
20mn
40mn
2h
Genome position (Kb)
Ter

Figure 1


A
RiTer
LiTer15
Genome position (Mb)
Ter2
Ter1
B
RiTer/RiTer mukB
RiTer/RiTer matP
LiTer15 / LiTer15 mukB
C
RiTer & RiTer mukB
LiTer15 & LiTer15 mukB
Riter
Riter mukB
LiTer15
LiTer15 mukB
Range of contact (Kb)
Range of contact(Kb)

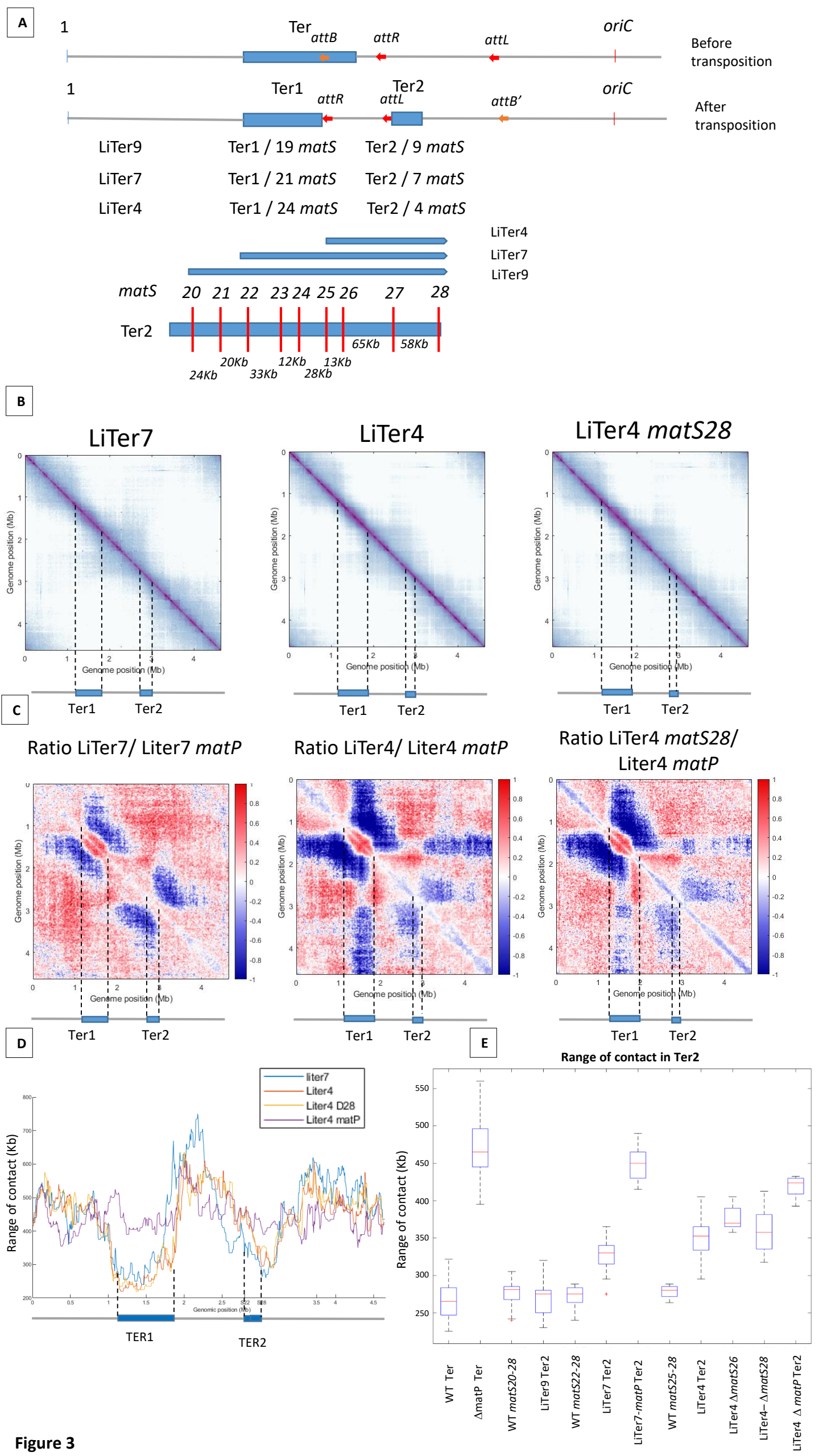
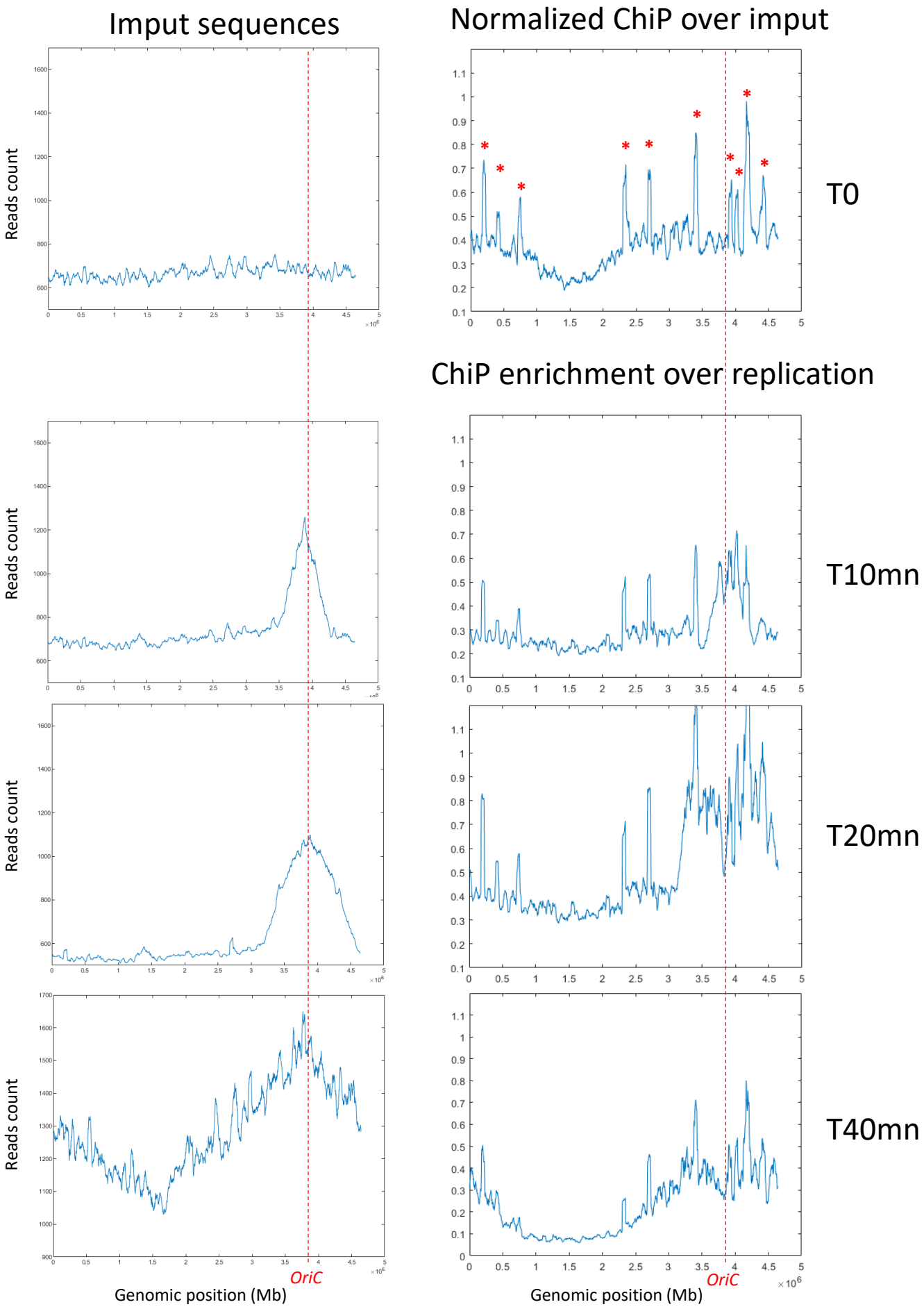

A
1
Ter
attB
attR
attL
oriC
Before transposition
1
Ter1
Ter2
attR
attL
attB'
oriC
After transposition
LiTer9
Ter1 / 19 matS
Ter2 / 9 matS
LiTer7
Ter1 / 21 matS
Ter2 / 7 matS
LiTer4
Ter1 / 24 matS
Ter2 / 4 matS
LiTer4
LiTer7
LiTer9
matS
20 21 22 23 24 25 26 27 28
Ter2
65Kb
58Kb
20Kb
12Kb
13Kb
24Kb
33Kb
28Kb
B
LiTer7
LiTer4
LiTer4 matS28
Genome position (Mb)
Ter1
Ter2
C
Ratio LiTer7/ Liter7 matP
Ratio LiTer4/ Liter4 matP
Ratio LiTer4 matS28/ Liter4 matP
D
liter7
Liter4
Liter4 D28
Liter4 matP
Range of contact (Kb)
Genomic position (Mb)
TER1
TER2
E
Range of contact in Ter2
Range of contact (Kb)
WT Ter
ΔmatP Ter
WT matS20-28
LiTer9 Ter2
WT matS22-28
LiTer7 Ter2
LiTer7-matP Ter2
WT matS25-28
LiTer4 Ter2
LiTer4 ΔmatS26
LiTer4– ΔmatS28
LiTer4 Δ matP Ter2

Figure 3

A


Imput sequences
Normalized ChiP over imput
ChiP enrichment over replication
Reads count
T0
T10mn
T20mn
T40mn
OriC
OriC
Genomic position (Mb)
Genomic position (Mb)

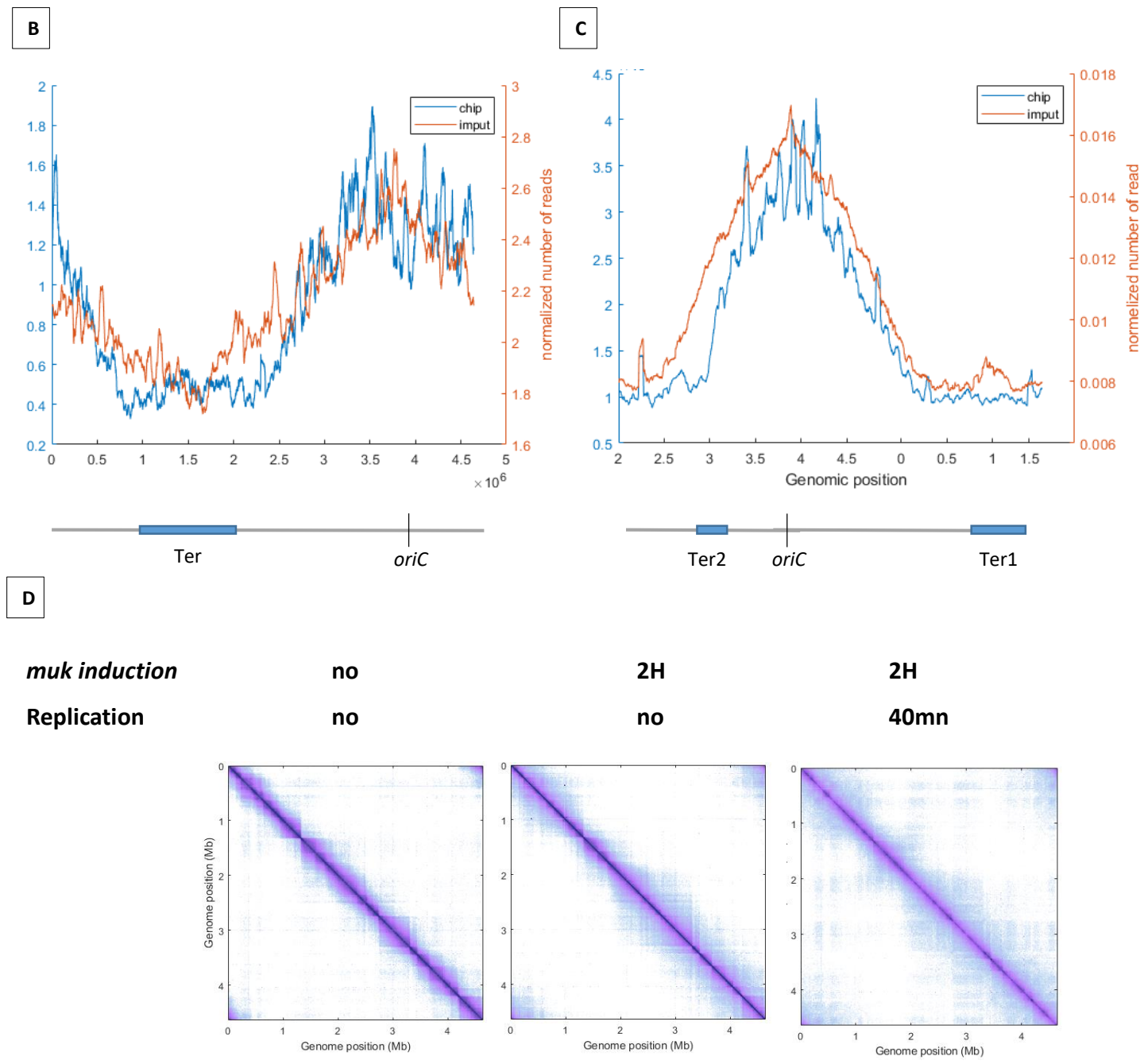

B
C
chip
imput
normalized number of reads
normelized number of read
Genomic position
Ter
oriC
Ter2
oriC
Ter1
D
muk induction
no
2H
2H
Replication
no
no
40mn
Genome position (Mb)

Figure 4

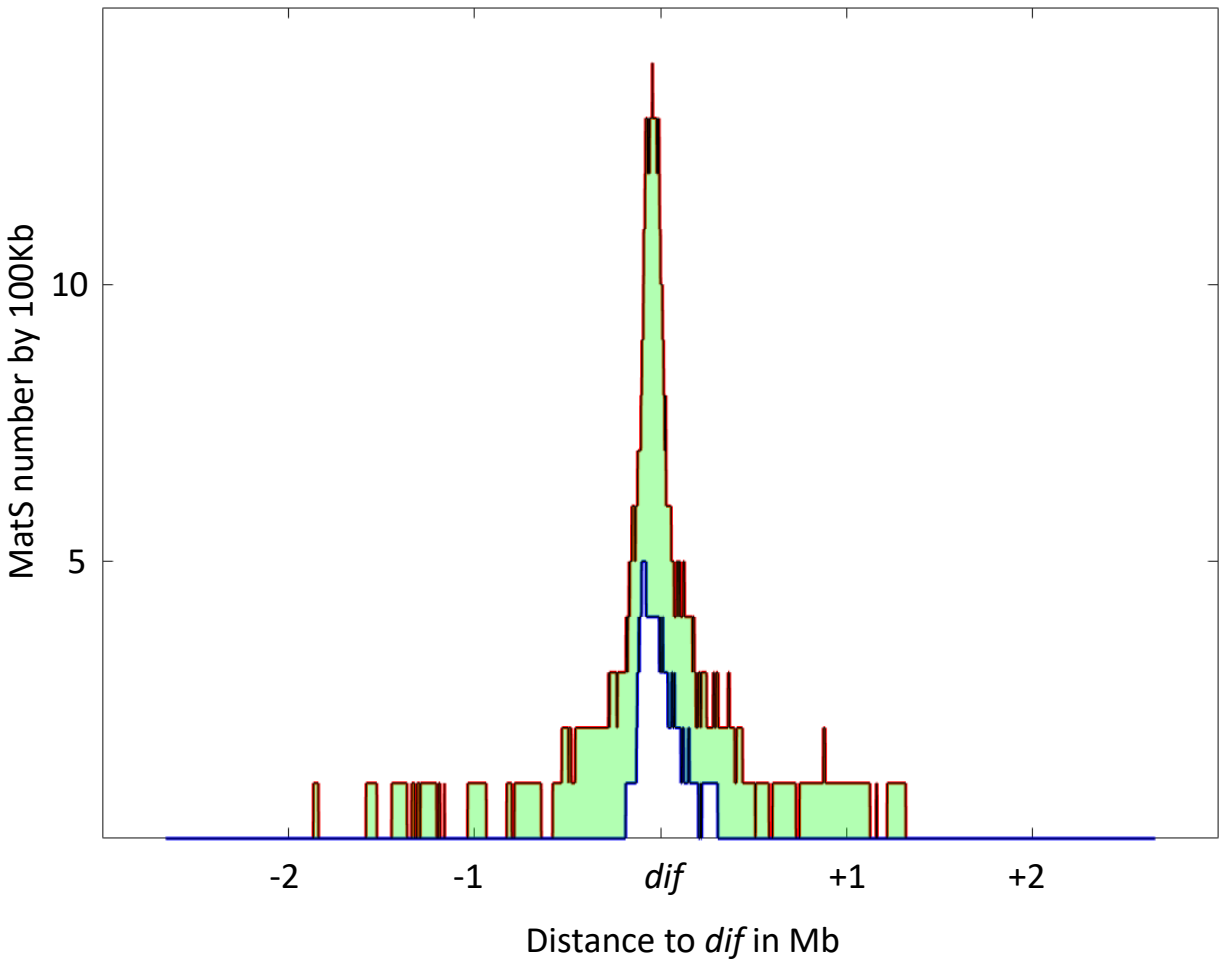


Figure 5

Figure 1 : MukBEF activity detected along the chromosome.

(A) Complementation of the Δ*mukF* mutant. Serial dilutions (10^{-1} to 10^{-5}) of an exponential culture of MG1655 (WT), MG1655 *ΔmukF* ppSV38, and MG1655 *ΔmukF* ppSV38::*mukBEF* were plated on media with (Right) or without (Left) inducer (IPTG). Plates were incubated at a permissive temperature of 22°C (top) or at a non-permissive temperature of 37°C (bottom).

(B): Percentage of anucleate cells (blue bars) in wild type (WT) and *mukF* mutant strains, complemented or not by the plasmid ppsV38::mukBEF, grown in minimal medium at 22°C with or without IPTG. Anucleate cells were identified and counted after DAPI staining. The histograms and error bars represent the means and standard deviations from at least three independent experiments.

(C): Normalized Hi-C contact maps (5Kb bin resolution) obtained from a *ΔmukF* strain complemented with ppsV38::*mukBEF* after different induction times (0 min, 40 min, 2 h). Cells were grown in permissive conditions at 22°C in minimal medium. The X and Y axes represent genomic coordinates in megabases (Mb).

(D) Ratio of normalized contact maps of *ΔmukF* ppSV38::*mukBEF* grown in the presence and absence of ITPG, represented in the left panel for 40 minutes of growth. The right panel shows the ratio of normalized contact maps for 2 hours of growth with and without ITPG. A decrease or increase in contacts in the induced condition compared with the non-induced condition is represented with a blue or red color, respectively. The black line represents a schematic chromosome, with the Ter domain highlighted in light blue.

(E) Quantification of the range of cis contacts of chromosomal loci along the chromosome of a *ΔmukF* ppsV38::mukBEF strain grown at 22°C under four different conditions: light blue (without ITPG), red (after 20 minutes of ITPG), yellow (after 40 minutes of ITPG), and purple (after 2 hours of ITPG).

Figure 2: MukBEF activity initiates at different regions of the *E.coli* chromosome.

(A) (left) Normalized 3C-seq 5kb bin contact map of strain RiTer and (right) normalized Hi-C 5Kb bin contact map of strain LiTer15. The positions of the two Ter segments are highlighted in blue on the scheme, and the dashed lines project their positions onto the matrix.

(B) Ratio of normalized contact maps of RiTer strain on RiTer *ΔmukB* strain (left), or RiTer on RiTer *ΔmatP* (middle), and LiTer15 on LiTer15 *ΔmukB* strain(right). A decrease or increase in contacts in the transposed cells compared to the transposed mutant cells is shown in blue or red color, respectively.

(C) The graph shows the quantification of the Hi-C diagonal width for loci along the chromosome of the RiTer strain (left panel, blue line) and the RiTer *ΔmukB* strain (left panel, red line), as well as LiTer15 (right panel, blue line) and LiTer15 *ΔmukB* strain (right panel, red line). Schematic representations of the two Ter segments are indicated below the graph, highlighting the fact that the range of contacts decreased on all Ter fragments.

Figure 3: The number and distribution of *matS* sites have different effects on MukBEF Inhibition.

(A) The figure shows a schematic representation of different transpositions with the number of *matS* sites located on each Ter region. The three *att* sites are integrated into the chromosome in the same orientation, and *attL*/*attR* are fixed positions on all LiTer transpositions. *attB* is inserted at different positions into the Ter allowing, upon transposition, the division of the Ter domain into two subdomains, Ter1 and Ter2, containing different numbers of *matS* sites. The number of *matS* sites is indicated for the different transpositions, and the distribution of *matS* on the Ter2 segment is indicated in the schematic for the three transposed strains, LiTer4, LiTer7, and LiTer9.

(B) Normalized Hi-C contact map with 5Kb bin resolution of the transposed strains LiTer7, LiTer4, and LiTer4 *ΔmatS28*. The position of the different Ter regions is highlighted below the matrix, and by dashed lines on the matrix.

(C) Ratio of normalized 5Kb bin contact maps for the different transpositions compared to the *matP* mutant on the same genetic organization. The position of the different Ter regions is highlighted below the ratio, and by dashed lines on the ratio.

(D) Quantification of the Hi-C diagonal width for loci along the chromosome for the transposed strains LiTer7, LiTer4, the derivative mutant LiTer4*ΔmatS28*, and LiTer4*ΔmatP*. The schematic map below represents the LiTer7 configuration. The position of the different Ter regions is highlighted below the graph, and by dashed lines on the graph.

(E) This panel quantifies the range of contacts in the Ter2 region or in the corresponding sequence on the wild-type (WT) configuration. Boxplot representations are used, indicating the median (horizontal bar), the 25th and 75th percentiles (open box), and the rest of the population.

Figure 4: *MukBEF preferentially binds in newly replicated regions and is exclude from Ter sequence*

(A) Immunoblot analysis of *mukB*-flag *dnaC2* strain. Exponentially growing cells were synchronized by being placed at 40°C for 2 hours, and then shifted to 30°C for 0, 10, 20 or 40 minutes. The progression of replication was followed by plotting the input sequence (left panel) by bin of 50Kb. Normalized ChIP 50 kb bins (ChIP over input) are presented for T0, and the red asterisk represents the peak presented in all *E. coli* ChIP-seq experiments. Replication enrichment 50 kb bins are presented for the time points 10, 20 and 40 minutes of replication, and correspond to the normalized ChIP over input of the corresponding time point divided by the T0 normalized ChIP over input. The *ori*C position is highlighted in red with a red dashed line.

(B) Superimposition of MukB ChiP enrichment in 50Kb bins in blue and sequencing input in orange, in synchronized cells after 40 minutes of replication. The orange curve shows that replication progresses through the Ter domain, while the MukB enrichment in blue stops at 0.8 and 2.4 Mb, a few hundred kilobases before the Ter.

(C) Superimposition of MukB normalized ChiP enrichment in 50Kb bins in blue in a LiTer7 background, and sequencing input in orange, in synchronized cells after 40 minutes of replication. The ChiP of MukB shows a decrease in enrichment in the Ter2 region.

(D) Normalized Hi-C 5 kb bin contact map of Δ*mukF* ppsV38::*mukBEF dnaC2* strain. Exponential cells were incubated at 40°C for 2 hours to prevent replication initiation (non-replicating condition) and were then shifted to 30°C for 40 minutes (right panel). MukBEF induction was performed by adding IPTG to the media for 2 hours.

Figure 5: Distribution of *matS* sites culminates at *dif* across γ-proteobacteria

The density of *matS* sequences over a 100kb-unit region was measured in 16 γ-proteobacteria, and the resulting distribution is plotted in the figure. The red line represents the 75th percentile of this distribution, while the blue line represents the 25th percentile. The light green area between these two lines represents the 50% of values closest to the median. The distribution is centered on the *dif* site, and the x-axis represents the genomic distance in megabases (Mb) from *dif*, while the y-axis represents the number of *matS* sequences per 100 kilobases (Kb).

	Ter size[a] (Kb)	*matS in the ter*[b]	*Chromsomosome size (Kb)*	*matS mean by 100Kb of Ter*[c]	Size Ter/size chromosome[d] (%)
Enterobacterals					
Escherichia coli	*1037*	*31*	*4641*	*3*	*22*
Salmonella enterica serovar	*722*	*27*	*4822*	*3.7*	*15*
Shigella dysenteriae sd197	*834*	*25*	*4560*	*3*	*18*
Klebsiella pneumoniae	*769*	*60*	*5317*	*7.8*	*14*
Erwinia amylovora	*435*	*19*	*3833*	*4.4*	*11*
Photorhabdus asymbiotica	*312*	*11*	*5064*	*3.5*	*6*
Pectobacterium carotovorum	*346*	*39*	*4886*	*11.3*	*7*
Yersinia pestis	*446*	*18*	*4658*	*4*	*10*
Pasteurellales					
Haemophilus haemolyticus	*111*	*6*	*1941*	*5.4*	*6*
Pasteurella canis	*332*	*11*	*2344*	*3.3*	*14*
Actinobacillus pleuropneumoniae	*506*	*15*	*2391*	*3*	*21*
Gallibacterium anatis	*350*	*6*	*2694*	*1.7*	*13*
Aggregatibacter actinomycetemcomitans	*506*	*15*	*2105*	*3*	*24*
Vibrionales					
Aliivibrio fischeri	*526*	*66*	*4343*	*12.5*	*12*
Photobacterium angustum	*409*	*77*	*4885*	*18.8*	*8*
Vibrio cholerae chr1	*750*	*34*	*2961*	*4.5*	*25*
Vibrio cholerae chr2	*452*	*14*	*1072*	*3.1*	*42*
Salinivibrio kushneri chr1	*613*	*37*	*2840*	*6*	*22*
Salinivibrio kushneri chr2	*314*	*20*	*602*	*6.4*	*52*

Table 1 : identification of *matS* sequence and Ter domain in *Gammaproteobacteria*

[a] Ter size in kilobases. Ter is defined as the longest stretch of DNA containing *matS* flanked by two regions of 100 kilobases devoid of *matS* sites

[b] Number of matS sites identified in the Ter region using the MEME Suite and based on the matS consensus sequence (see Supplementary Figure 3c).

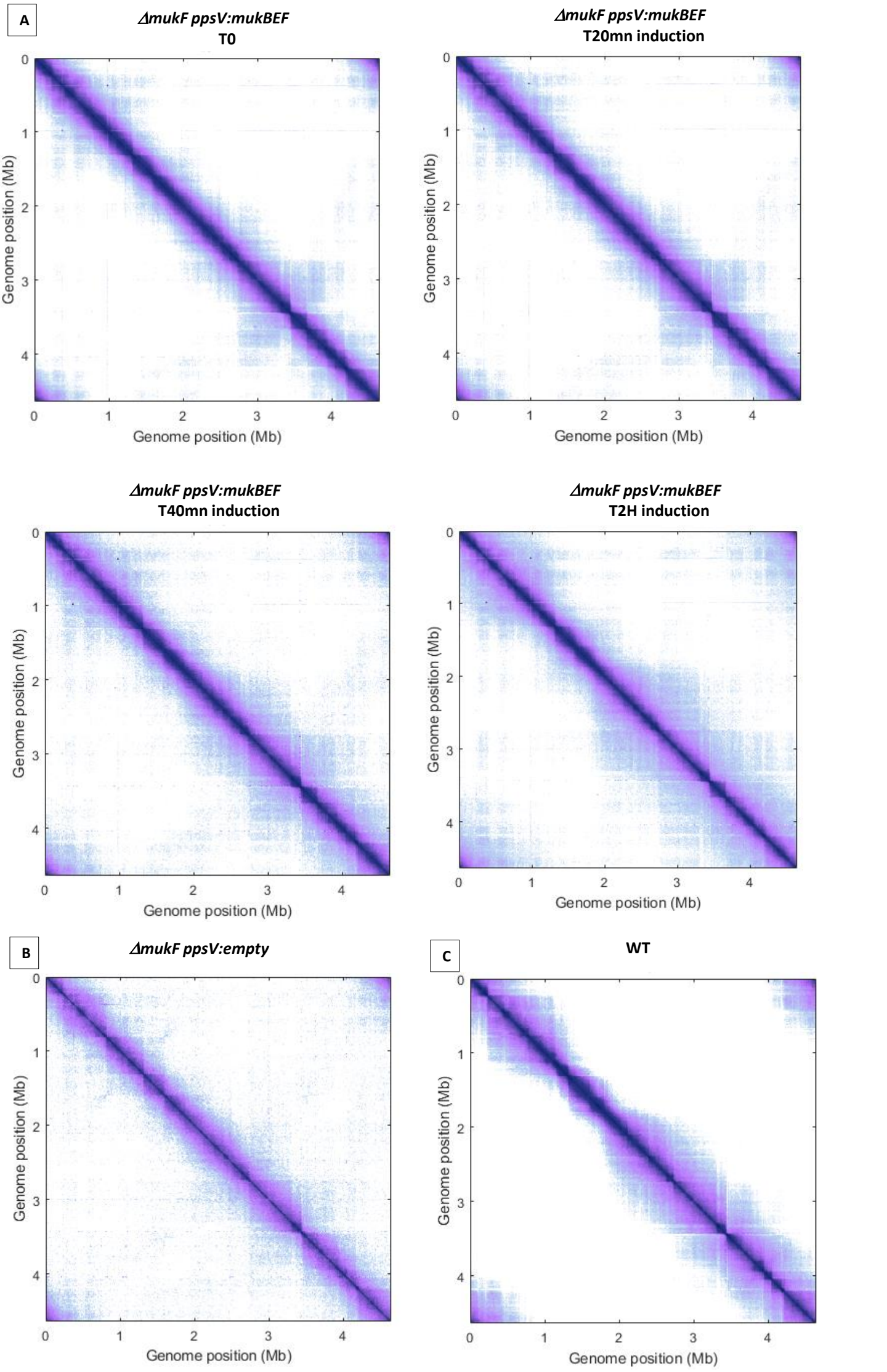
[c] matS density inside the Ter region calculated as the number of matS sites divided by the size of the Ter region.

[d] Proportion of the Ter region compared to the entire chromosome, expressed as a percentage.

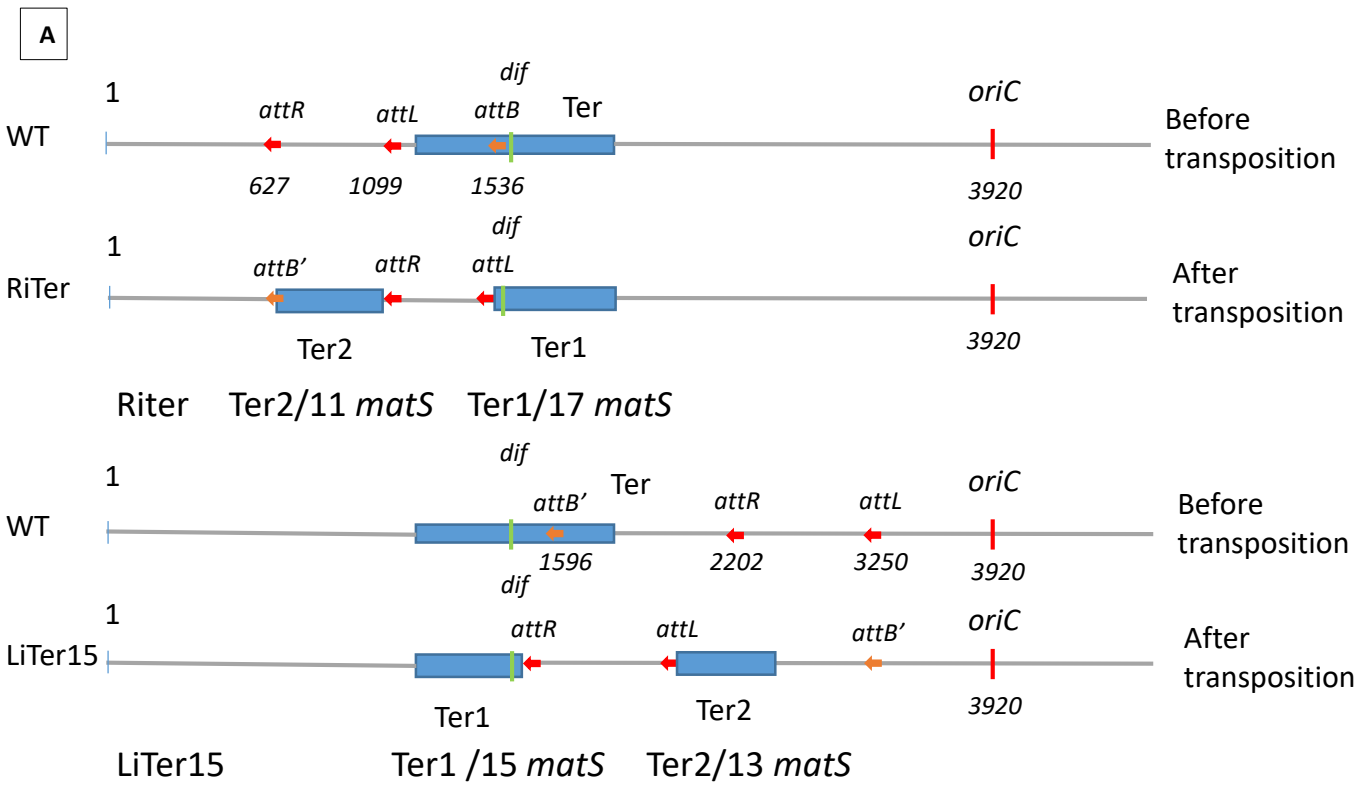
Strain name	Description		Macrodomaines coordinates		Reference
WT (before transposition)	*MG1657 (MG1655 ΔlacIZ phi80⁺ΔattB::aadA)*		Ori(3.7Mb-4.6Mb)-NSR(0-0.6Mb)-Right(0.6-1.2Mb)-Ter(1.2-2Mb)-Left(2-2.8Mb)-NSL(2.8-3.7Mb)		(Valens et al., 2004)
	Transposition coordinates			**Configuration after transposition**	
	attL	**attR**	**attB**		
RiTer	1099533	651775	1532480	Ori-NSR-Right(152Kb)-Ter2(330Kb)-Right(447 Kb)-Ter1(470Kb)-Left-NSL	This work
	attL	**attR**	**attB**		
LiTer15	3250851	2202961	1596000	Ori-NSR-Right-Ter1(390Kb)-Left(1Mb)-Ter2(410Kb)-Left(202Kb)-NSL(449Kb)	This work
LiTer9			1710441	Ori-NSR-Right-Ter1(501Kb)-Left(1Mb)-Ter2(299Kb)-Left(202Kb)-NSL(449Kb)	This work
LiTer7			1746766	Ori-NSR-Right-Ter1(550Kb)-Left(1Mb)-Ter2(250Kb)-Left(202Kb)-NSL(449Kb)	This work
LiTer4			1814000	Ori-NSR-Right-Ter1(610Kb)-Left(1Mb)-Ter2(190Kb)-Left(202Kb)-NSL(449Kb)	This work
LiTer4 ΔmatS28				Ori-NSR-Right-Ter1(610Kb)-Left(1Mb)-Ter2(133Kb)-Left(259Kb)-NSL(449Kb)	This work

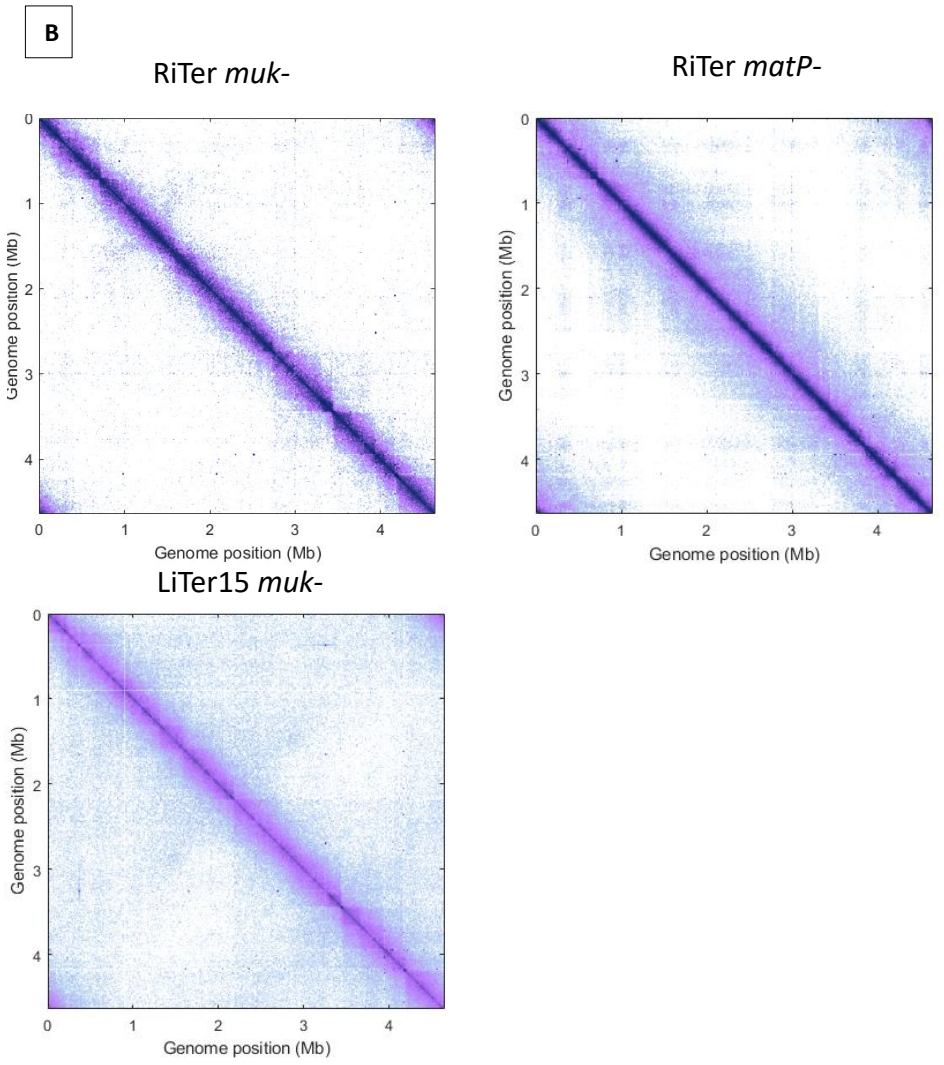
MG1655 (F- lambda- ilvG- rfb-50 rph-1)	lab collection
MG1657 (MG1655 ΔlacIZ phi80^{+}ΔattB::aadA)	(Valens et al., 2004)
MG1655 dnaC2 tet MukB-Spa-TAG cm	this paper
MG1655 dnaC2 tet MukB-Spa-TAG apr	this paper
MG1655 dnaC2 tet MukB-Spa-TAG apr ΔmukF::cm	this paper
MG1655 matP-spa cm	(Dupaigne et al., 2012)
MG1655 matPC20-spa cm	this paper
MG1655 matP-spa ΔmatS9::kan-10::zeo-11::cm-12::apr	this paper
MG1657 Riter MG1657 attL cm 1099533 attR kan 651775 attB apr 1532480	this paper
MG1657 Riter ΔmatP zeo	this paper
MG1657 Riter ΔmukB zeo	this paper
MG1657 Liter15 MG1657 attL cm 3250851 attR kan 2202961 attB apr 159600	this paper
MG1657 Liter15 ΔmukB::apr	this paper
MG1657 Liter9 MG1657 attL cm 3250851 attR kan 2202961 attB apr 1710441	this paper
MG1657 Liter7 MG1657 attL cm 3250851 attR kan 2202961 attB apr 1746766	this paper
MG1657 Liter7 ΔmatP zeo	this paper
MG1657 Liter7 dnaC2 tet tet MukB-Spa-TAG cm	this paper
MG1657 Liter4 MG1657 attL cm 3250851 attR kan 2202961 attB apr 1814000	this paper
MG1657 Liter4 ΔmatS26::zeo	this paper
MG1657 Liter4 ΔmatS28::apr	this paper
MG1657 Liter4 ΔmatP::zeo	this paper
MG1655 matP5A apr	this paper
MG1655 ΔmukF::cm	this paper
MG1655 ΔmukB::apr	this paper
MG1655 ΔmukF::cm ppSV::empty	this paper
MG1655 ΔmukF::cm ppSV::mukBEF	this paper

Strain name	*matS sites* positions			
	matS1		***matS28***	
WT	1136538		1974386	
LiTer15	**Ter1**		**Ter2**	
	matS1	***matS13***	***matS14***	***matS28***
	1136538 bp	1563282 bp	2648362 bp	3022276 bp
LiTer9	***matS1***	***matS19***	***matS20***	***matS28***
	1136538 bp	1704014 bp	2769807 bp	3022276 bp
LiTer7	***matS1***	***matS21***	***matS22***	***matS28***
	1136538 bp	1745151 bp	2813103 bp	3022276 bp
LiTer4	***matS1***	***matS24***	***matS25***	***matS28***
	1136538 bp	1810136 bp	2886716 bp	3022276 bp
LiTer4 ΔmatS28	***matS1***	***matS24***	***matS25***	***matS27***
	1136538 bp	1810136 bp	2886716 bp	2964754 bp



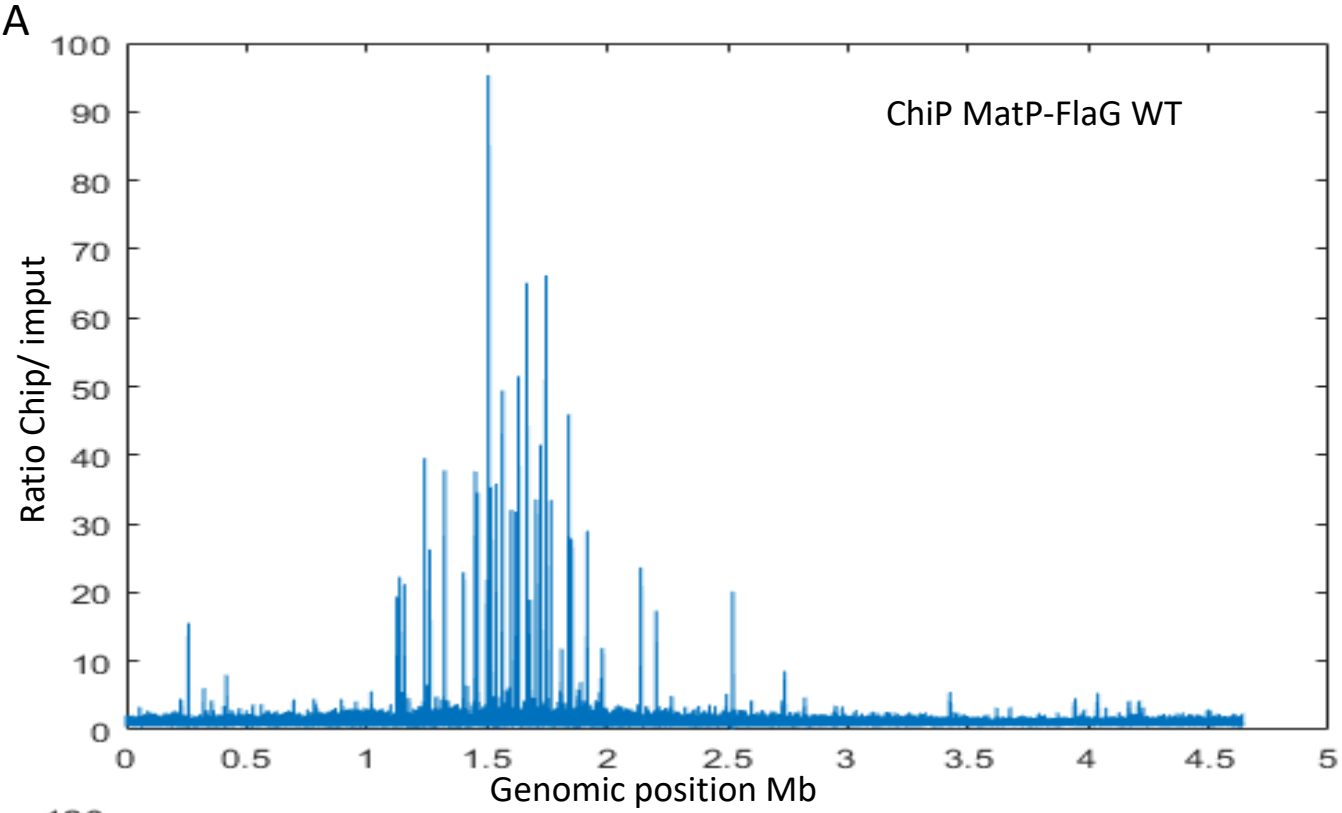
Suplementary Figure 1

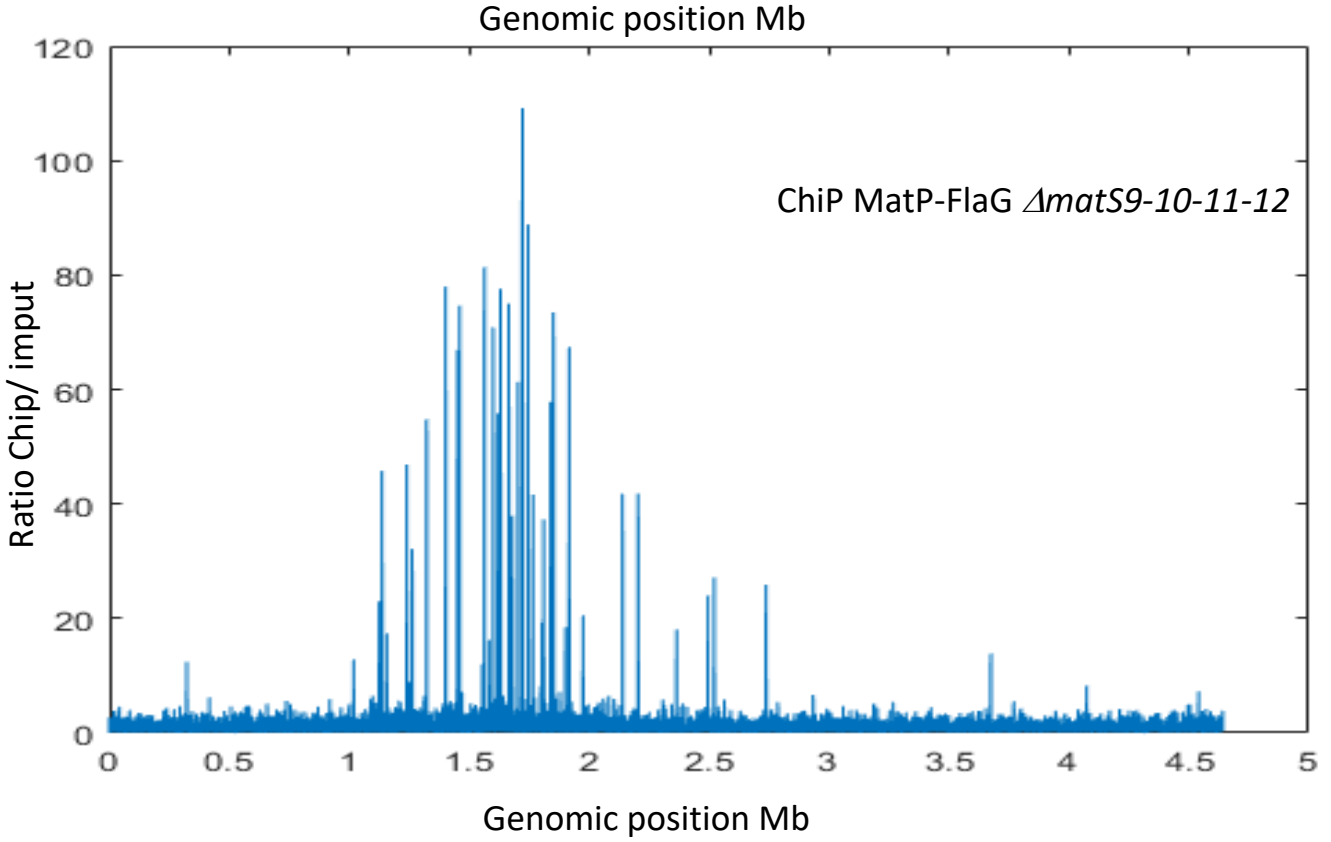


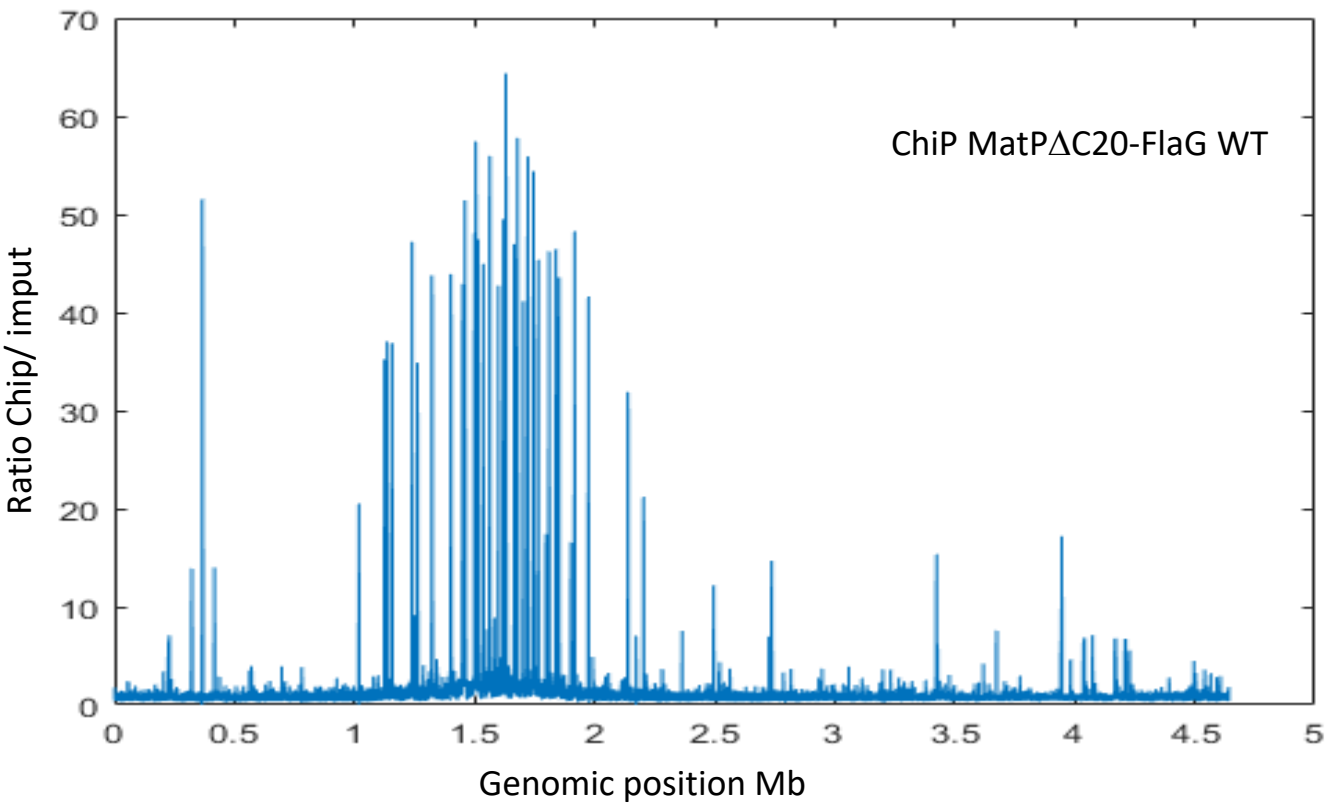


Suplementary Figure 2

A

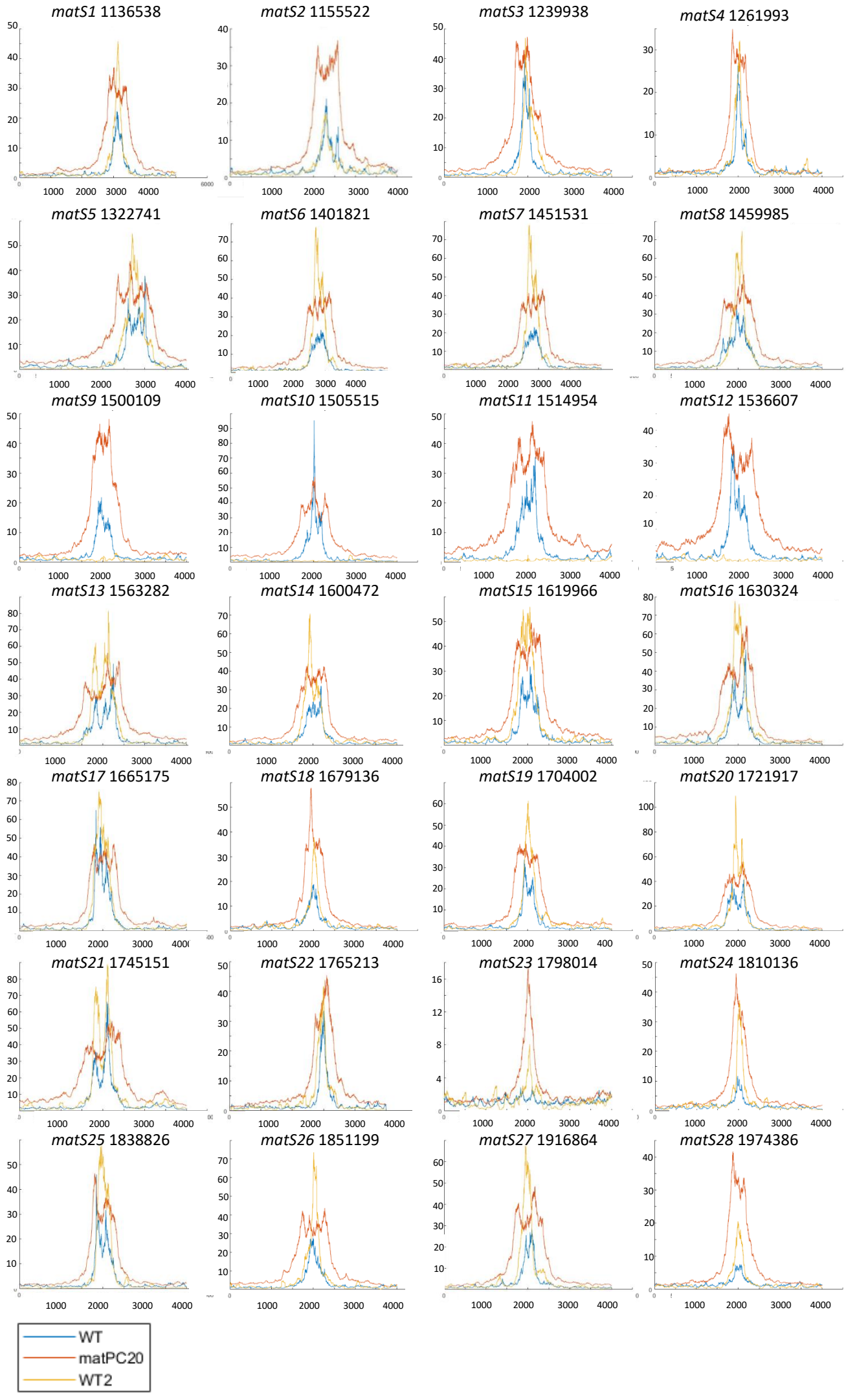






Suplementary Figure 3

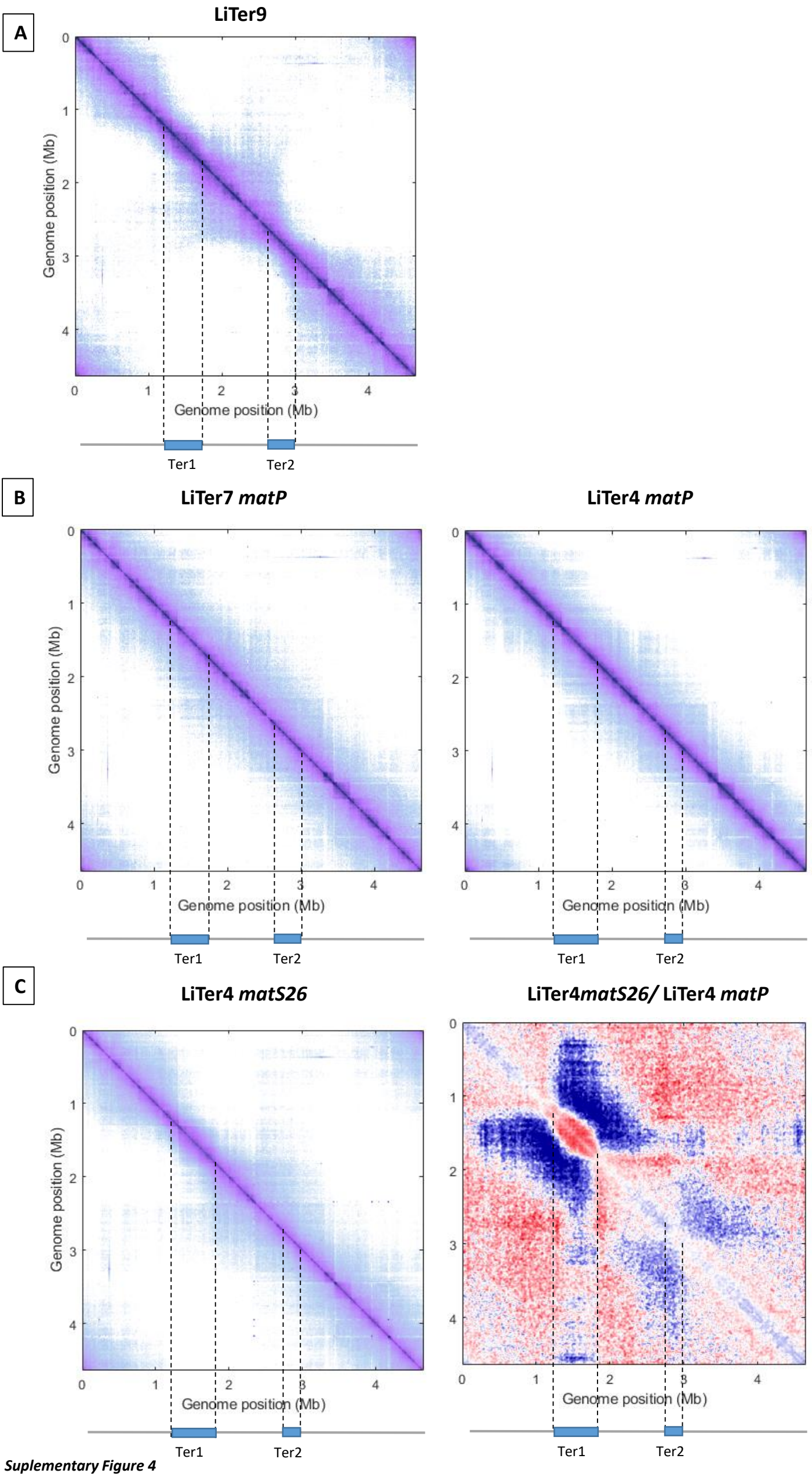
B



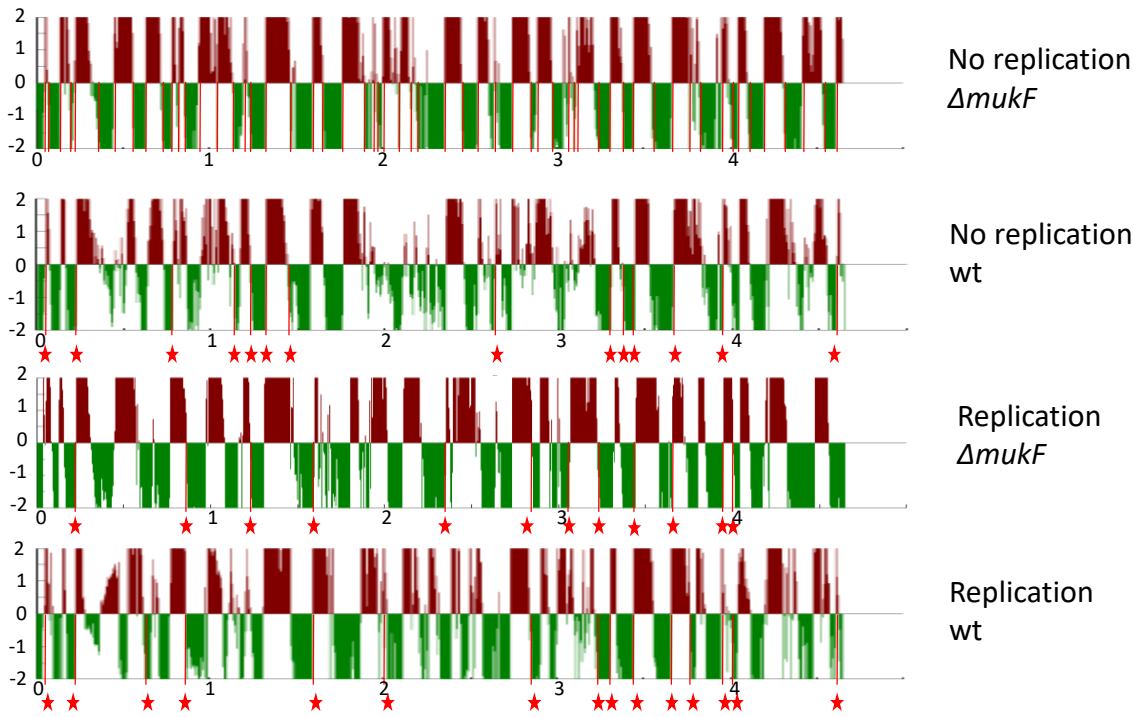
C

E-value 8,9 e-61

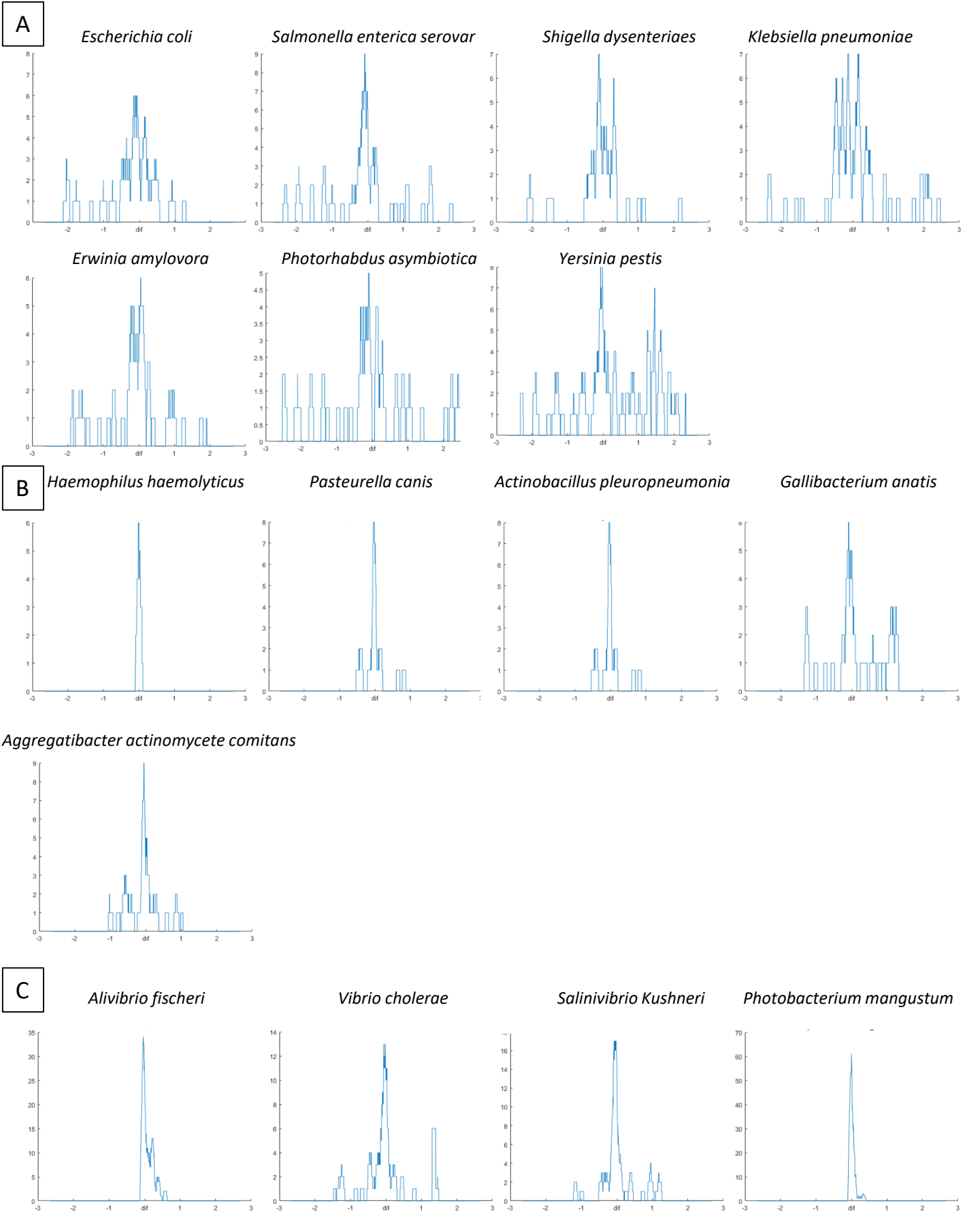
Suplementary Figure 3



Suplementary Figure 4



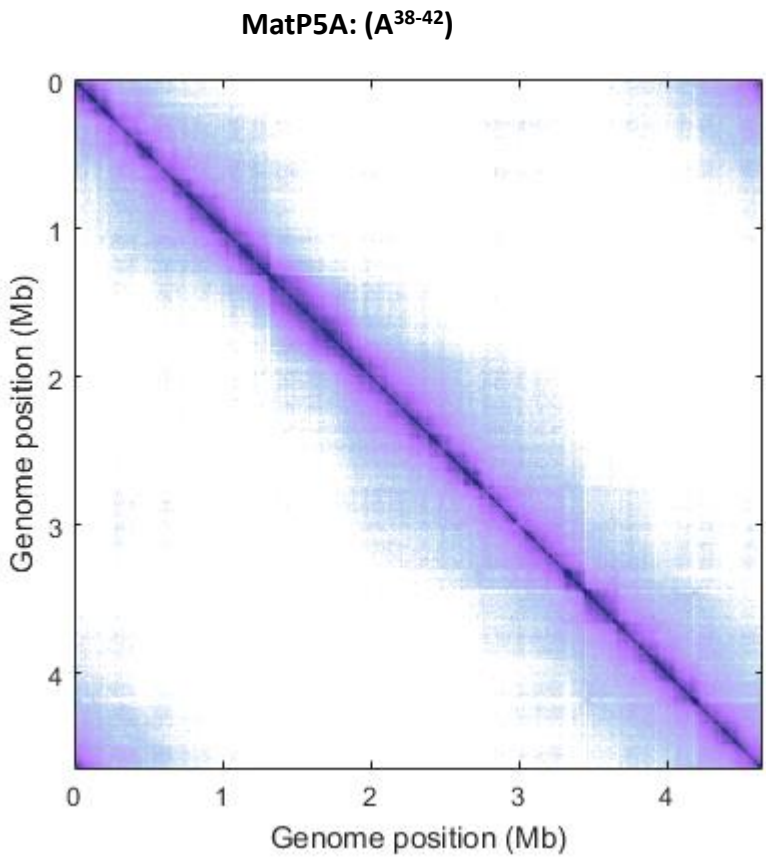
Suplementary Figure 5



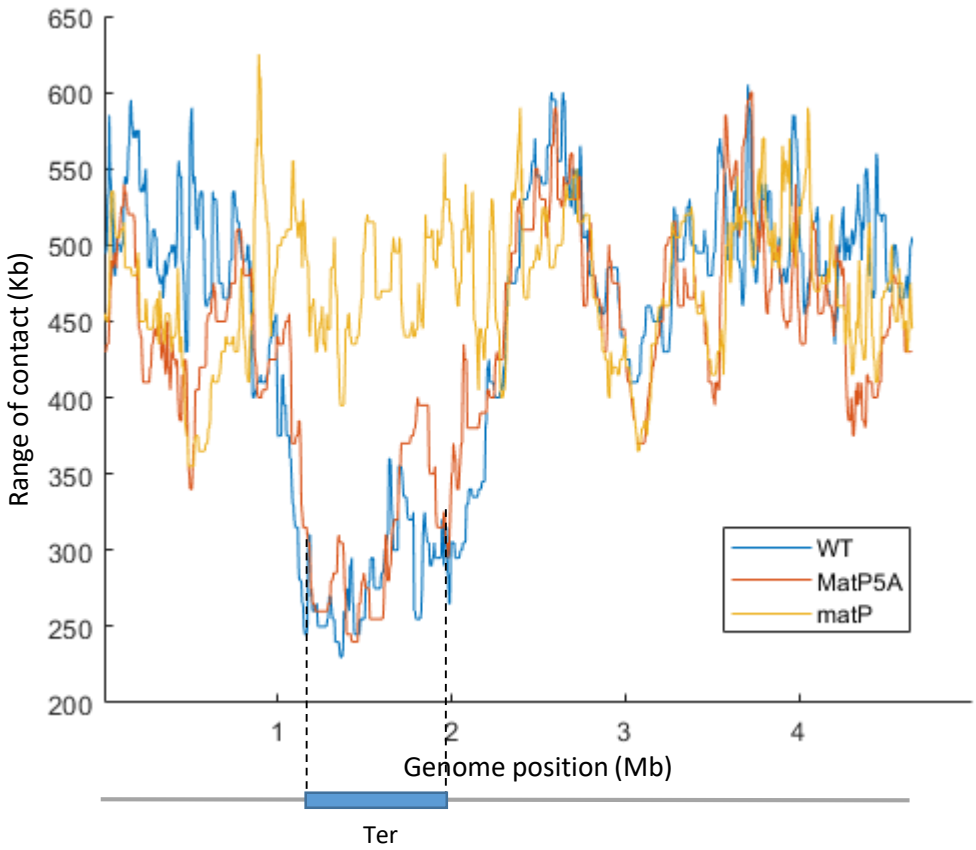
Suplementary Figure6

A

MatP5A: (A^{38-42})



B



Suplementary Figure 7

Supplementary Figure legends.

Supplementary Figure 1:

(A) shows a normalized Hi-C 5Kb bin contact map of the *ΔmukF* ppsV::mukBEF strain. Cells were grown in minimal medium at 22°C, and IPTG was added at 0, 20, 40, and 120 minutes before formaldehyde crosslinking. This figure represents an independent experiment from the one shown in Figure 1. In addition, the figure also includes representations of a D*mukF* strain with an empty plasmid (B) and a wild-type (WT) strain (C) grown under the same conditions.

Supplementary Figure 2:

(A) Schematic representation of transpositions. The three *att* sites are integrated into the chromosome with the same orientation at the indicated position (in Kb) and in the wild-type (WT) configuration. The region between the attL and attR sites is transposed to the attB position, generating the transposed strain. The dif sequence is represented in green and the oriC in red to orient the chromosome. The distribution of matS between the two resulting Ter regions is indicated below the schematic.

(B) Normalized 3C-seq 5Kb bin contact map of the RiTer *muk*- and RiTer *matp*-, and HiC 5Kb bin contact map of LiTer15 *muk*- strains growth in MM at 22°C.

Supplementary Figure 3:

(A) Normalized ChiP-to-imput ratio representation of Three independent ChIP-seq. The first experiment used MatP-3XFlag in a wild-type background, the second used the same MatP-3XFlag in a genetic background where the *matS* sites 9-10-11-12 were deleted, and the third experiment used MatPΔC20-3XFlag in a wild-type background.

(B) Representation of the 28 *matS* ChiP signals from the three experiments. As expected, matS9-10-11-12 did not show any ChIP signals in the deleted strain.

(C) Consensus sequence of MatP binding, built using the Meme suite based on the ChIP-seq sequences from the three experiments.

Supplementary Figure 4:

(A) Normalized Hi-C 5Kb bin contact map of LiTer9 strain. The cell was cultivated at 22°C in MM. The two Ter fragments, containing 21 matS (Ter1) and 9 matS (Ter2), are highlighted in blue.

(B) Normalized Hi-C 5Kb bin contact map of LiTer7 *ΔmatP* and LiTer4 *ΔmatP* strains, with the position of the Ter segment marked on the schematic below. These Hi-C matrices were used to build the ratio of the matrix in Figure 3.

(C) Normalized Hi-C 5Kb bin contact map of LiTer4 Δmat26 (left) and the ratio of normalized contact maps of LiTer4 Δmat26 to LiTer4 ΔmatP (right).

Supplementary Figure 5:

Domain boundaries were characterized for each condition using a DI (Directionality Index) analysis performed at a scale of 100 kb. Downstream (red) and upstream (green) biases are indicated. Significant DI boundaries defining Chromosomal Interaction Domains (CIDs) (Le et al., 2013) are represented with red marks under the condition where replication was absent in the *ΔmukF* strain (*ΔmukF* no replication), as shown in the top panel. Boundaries that are similar to those identified in the *ΔmukF* no replication condition are annotated with a star symbol.

Supplementary Figure 6:

Representation of *matS* density. The y-axis represents the number of *matS* sites per 100Kb, while the x-axis represents the position on the chromosome in Mb centered on the dif sequence. In panel A, data is shown for seven species belonging to the *Enterobacteriales* group, in panel B, data is shown for five species belonging to the *Pasteurellales* group (fewer matS sequences were identified in the pasteurellales genomes, indicating a potential divergence of *matS* sequences within this group of bacteria), and in panel C, data is shown for four species belonging to the *Vibrionales* group. For *Vibrio cholerae* and *Salinivibrio kushneri*, only chromosome 1 was included in the analysis.

Supplementary Figure 7:

(A) Normalized Hi-C 5Kb bin contact map of MatP5A. The cell was cultivated at 22°C in MM. MatP5A, is a substitution of the 5AA H38 to D42 by five alanine.

(B) Quantification of the range of cis contacts for chromosomal loci along the chromosome in *matP5A* (red line), WT (blue line), and *ΔmatP* (yellow line) strains. The contact profile of the matP5A strain is similar to the WT strain, and the substitutions in *matP* does not trigger an increase in long-range DNA contacts in the Ter region, as would be expected for a matP deficient in inhibiting MukBEF.

Résultats supplémentaires

La complémentation par l'expression de *mukF*

En suivant l'apparition des contacts à longue distance induits par MukBEF, nous avons pu observer l'activité de MukBEF sur le chromosome et mettre en évidence que cette activité ne se manifeste pas en un point unique du chromosome, mais simultanément sur toute sa séquence. Nous avons également observé, grâce à la technique de ChIP-seq, une augmentation de la présence de MukB sur l'ADN dans les zones nouvellement répliquées. Afin de combiner ces deux approches, nous avons cherché à mettre en place un système d'induction dans lequel seule la sous-unité MukF de la condensine est sous la dépendance d'un promoteur inductible. Cette approche devrait permettre d'éviter une surexpression de la condensine, car l'expression des deux autres sous-unités indispensables à son activité dépend toujours de leur propre promoteur. De plus, l'expression de MukF dans un contexte *ΔmukF mukB-Spa* devrait permettre de suivre à la fois la dynamique de l'activité de MukBEF sur le chromosome par Hi-C et son enrichissement par Chip-Seq. Pour ce faire, nous avons cloné le gène *mukF* dans deux plasmides différents avec un nombre de copies moyen, ces deux plasmides permettant une expression de *mukF* inductible à l'IPTG et à l'anhydrotétracycline (aTc).

Nous avons constaté avec plusieurs systèmes construits auparavant qu'une faible expression de *mukBEF* était suffisante pour restaurer la croissance à 37°C de mutant *mukB*. Ainsi, pour établir un véritable système inductible sans fuite d'expression de *mukF* en l'absence d'inducteur, nous avons délété les signaux d'initiation de traduction « *RBS* » (*ribosome binding site*) localisés sur le vecteur et nous avons également remplacé le codon d'initiation de *mukF* ATG par TTG. Ainsi, le plasmide *pZE21:Δrbs-TTG-mukF permet une synthèse controlée de mukF qu'en présence de l'inducteur*. Pour le plasmide *pPSV38::mukF,* nous n'avons pas modifié les séquences du gène *mukF* et ni celles des signaux d'initiation de traduction. La transformation des deux plasmides dans une souche *ΔmukF* permet de pousser à 37°c en présence de l'inducteur, tandis qu'on n'observe pas de croissance en l'absence d'inducteur. Les souches de contrôle *ΔmukF transformées par les vecteurs sans insert* ne poussent pas également à 37°C confirmanat que la restauration de croissance résultant bien de l'expression de *mukF*.
Le pourcentage de cellules anucléées d'un mutant *Δmuk* en milieu minimum (glucose et casamino acides) à 22°C est environ 20%. Le comptage des cellules anucléées en milieu minimum à 22°C pour le système *pZE21:Δrbs-TTG-mukF* montre un taux de cellules anucléées proche de 10% après 4h d'induction par l'aTc, tandis qu'en absence d'inducteur le taux de

cellules anucléées est de l'ordre de 15%. En ce qui concerne le plasmide *pPSV38::mukF*, le taux de cellules anucléées est de 17 % en absence d'inducteur "IPTG", alors que l'induction continue permet un taux de cellules anucléées de 5% à 22°C en milieu minimum (glucose et casamino acides) **(Figure 30 A)**. Ces résultats indiquent que les deux systèmes complémentent le taux de cellules anucléées à 22°C.

La conformation du chromosome après induction de *mukF*

Après avoir vérifié la complémentation de la croissance et le taux des cellules anucléées par l'induction de *mukF*, nous avons effectué des expériences 3C-seq/HiC dans des conditions d'induction continue de *mukF* par les deux plasmides *pZE21:Δrbs-TTG-mukF* et *pPSV38::mukF* en milieu minimum à 22°C dans une souche *ΔmukF*.

Les matrices de 3C-seq/HiC ne montrent pas de formation des contacts en *cis* à longue distance (>800 kb) après induction continue de *mukF* par les deux systèmes **(Figure 26 *pZE21*) (Figure 28 *pPSV38*, cellules synchronisées) et (Figure 30 B les deux systèmes induits en continu à 22°c)**. Ces résultats indiquent que la surexpression de *mukF* ne permet pas de restaurer des contacts en *cis* à longue distance, bien que ces systèmes complémentent l'absence de MukF pour la ségrégation des chromosomes.

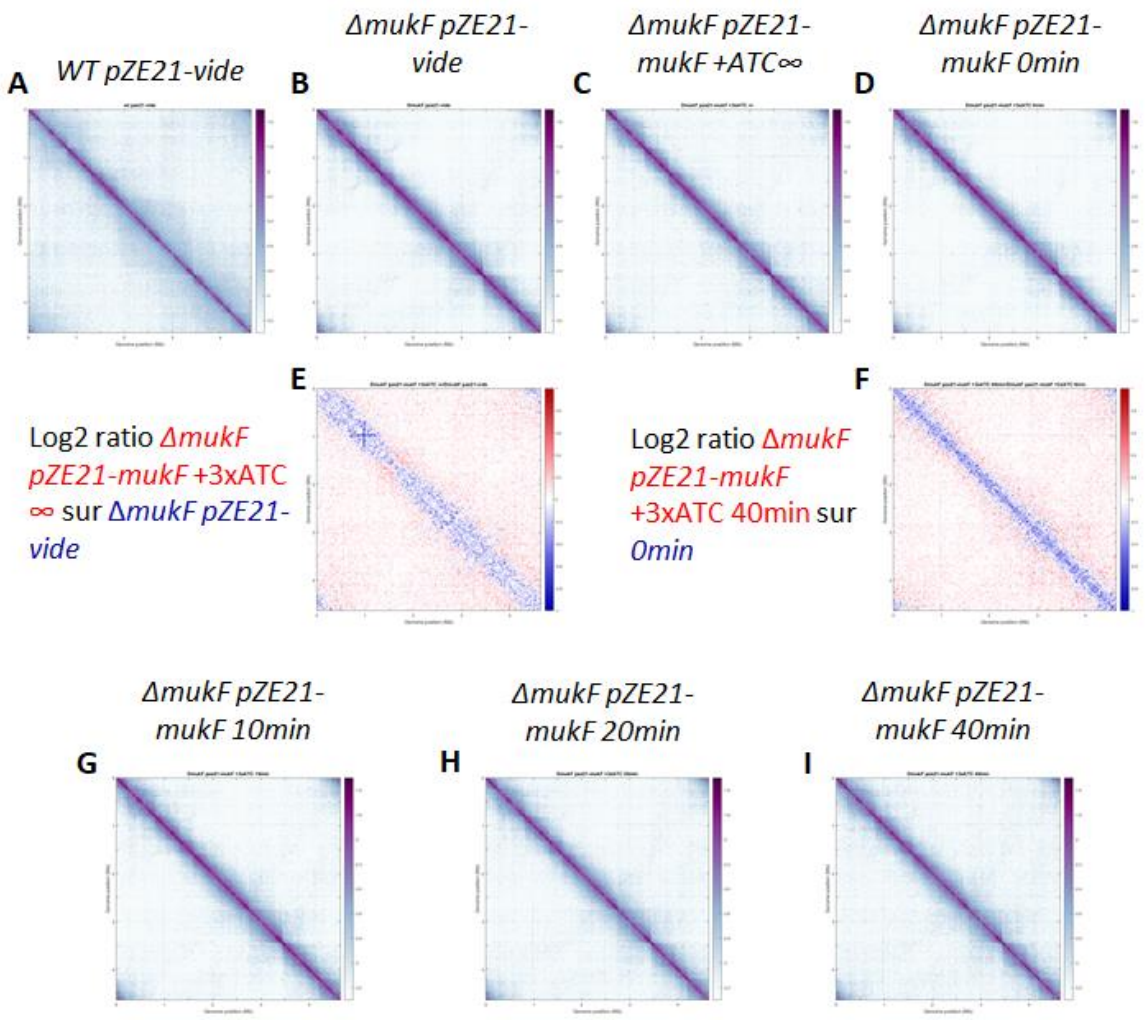


Figure 26 : Cinétique d'induction de mukF avec le plasmide pZE21 inductible à l'ATC. Matrice normalisées 3C-seq 5Kb-bin, matrices 3C-seq des souches, *WT pZE21-vide (A), ΔmukF pZE21-vide (B), ΔmukF pZE21-mukF ∞ (C); (E-F)* comparaison des conformations du chromosome dans différentes conditions, (E) Log2 ratio *DmukF pZE21-mukF* +3xATC ∞ sur *ΔmukF pZE21-vide*, (F) *Log2 ratio ΔmukF pZE21-mukF* +3xATC 40min sur 0min; cinétique d'induction de mukF après ajout de ATC (G) 20min, (H) 20min, (I) 40min.

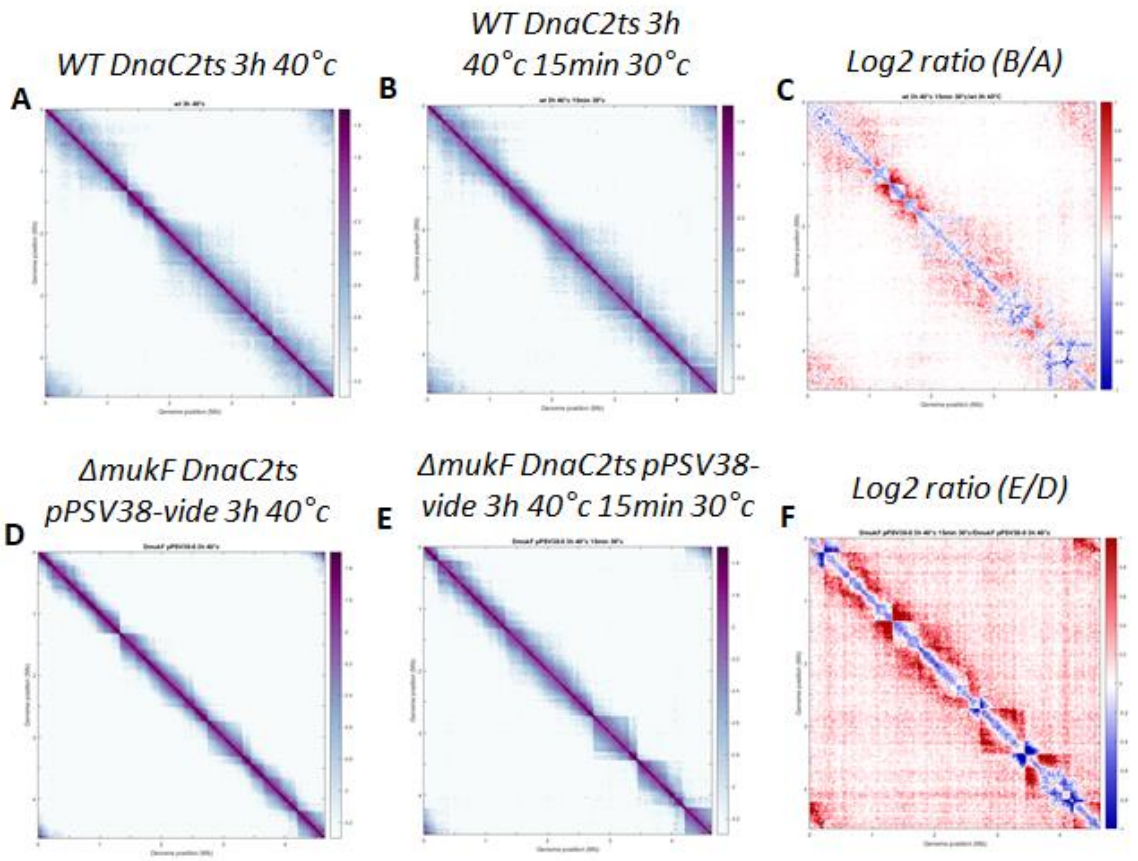


Figure 27 : Effet de la réplication et de MukBEF sur la conformation du chromosome. Matrices normalisées HiC 5Kb-bin.
Expériences HiC sur des populations de cellules synchronisées, de la souche MG1655 (*WT*) *dnac2ts* réplication bloquée 3h à 40°c **(A)** et après redémarrage de la réplication 15min à 30°c **(B)**. Visualisation de l'effet de la réplication sur la conformation du chromosome par le log2 ratio (B/A) **(C)**.
Expériences HiC sur des populations de cellules synchronisées, de la souche MG1655 *ΔmukF Dnac2ts pPSV38-vide* réplication bloquée 3h à 40°c **(D)** et après redémarrage de la réplication 15min à 30°c **(E)**. Visualisation de l'effet de la réplication sur la conformation du chromosome par le log2 ratio (E/D) **(F)**.

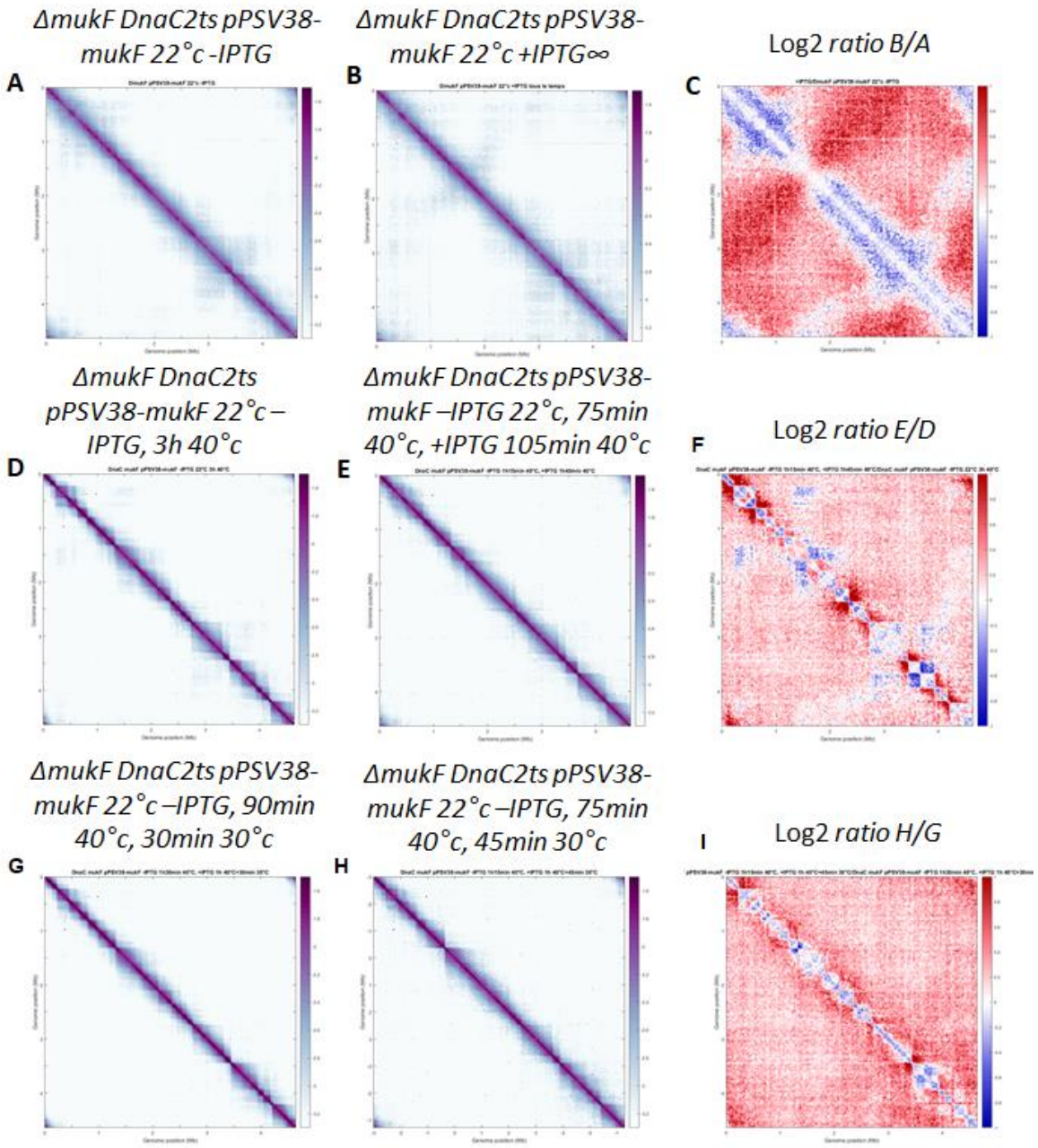


Figure 28 : Complémentation du mutant mukF par le plasmide *pPSV38-mukF* inductible à l'IPTG. Matrices normalisées HiC 5Kb-bin, expériences HiC sur des populations de cellules de la souche MG 1655 *ΔmukF DnaC2ts pPSV38-mukF* non synchronisées à 22°c **(A)** sans induction (-IPTG), **(B)** induit tous le temps (+IPTG∞), (C) visualisation de l'effet de l'induction de *mukF* sur la conformation du chromosome par log2 ratio (B/A); Expériences HiC sur des populations de cellules de la souche MG 1655 *ΔmukF DnaC2ts pPSV38-mukF* synchronisées **(D)** 3h à 40°c sans induction de *mukF* et **(E)** 75min à 40°c pour synchroniser, et 105min d'induction de *mukF* à 40°c sans réplication, **(F)** visualisation de l'effet de l'induction de *mukF* sur la conformation du chromosome; en absence de réplication par log2 ratio (E/D); Expériences HiC sur des populations de cellules de la souche MG 1655 *ΔmukF DnaC2ts pPSV38-mukF* synchronisées après redémarrage de la réplication **(G)** synchronisation 90min à 40°c, redémarrage de la réplication pendant 30min à 30°c, en absence de *mukF* (sans induction), **(H)** synchronisation 75min à 40°c, redémarrage de la réplication pendant 45min à 30°c en présence de *mukF* (H), **(I)** visualisation de l'effet de l'induction de *mukF* en présence et en absence de réplication par log2 ratio (H/G).

La formation des contacts par MukBEF après redémarrage de réplication

Etant donné que l'induction de *mukF* par les deux plasmides ne complémente pas les contacts en *cis* à longue distance, nous avons utilisé le plasmide *pPSV38::mukBEF* pour induire la formation de ces contacts dans des populations de cellules synchronisées en arrêt ou en cours de réplication. La synchronisation est effectuée grâce à l'allèle *dnaC2*^{ts} à température non permissive à 40°c pendant 2h. L'effet de la réplication sur la conformation du chromosome dans des souches wt et *muk*- a été réalisé de la même manière, par l'utilisation de l'allèle *DnaC2ts* **(Figure 27).** Sur une population de cellules *dnaC2ts ΔmukF pPSV38 ::mukBEF* (non induit) synchronisées 2h à 40°C, nous avons effectué trois expériences de HiC dans les conditions suivantes:

- induction de *mukBEF* 40min à 40°C, sans redémarrage de la réplication ;
- induction de *mukBEF* 40min à 30°C (l'induction et le redémarrage de la réplication sont effectués simultanément),
- redémarrage de la réplication 40min à 30°C, sans induction de *mukBEF*.

La comparaison entre les matrices obtenues, après induction de MukBEF sans réplication, et induction avec réplication pendant 40 min en faisant log2 du ratio des deux matrices ne montre pas de différences notables dans la formation de contacts par MukBEF **(Figure 32)**. Ce résultat n'était pas attendu, car l'induction de MukBEF 40 min à 22°c est suffisant pour voir une différence avec un *muk*- dans les mêmes conditions (voir l'article, **Figure 1**).
Ce résultat peut s'expliquer par deux raisons : soit le système d'induction de l'expression de *mukBEF* lors du redémarrage de la réplication n'est pas assez efficace pour permettre de réaliser des contacts en cis à longue distance, soit MukBEF n'est pas capable de former des contacts cis de longues distance au niveau des régions néo-répliquées.

Interaction physique directe entre MatP et MukBEF

Plusieurs publications ont montré qu'il existe une interaction directe entre MukB et MatP ; une interaction entre le domaine "Hinge" de MukB et MatP en particulier a été mise en évidence. Afin de vérifier si cette interaction physique est directe et pour pouvoir générer des mutants affectés dans cette interaction, nous avons réalisé des expériences de double hybride chez la levure *S. cerevisiae*, en utilisant différents domaines de MukB (MukB-N-Ter, MukB-C-Ter et MukB-Hinge) et de MatP (MatPΔN-Ter et MatPΔ-C-Ter). Plusieurs redécoupages de ces domaines d'interactions ont également été réalisés, notamment centré sur le Hinge de MukB en choisissant un domaine plus ou moins grand. Nous avons également tenté d'observer cette

interaction en utilisant les protéines entières MukB, MukE, MukF et MatP. Les résultats obtenus ont reproduit les contacts attendus MukE-MukF et MatP-MatP précédemment observés par d'autres approches, soulignant la fonctionnalité du système double hybride choisi. Néanmoins, plusieurs constructions ont montré des phénotypes d'auto-activation (capacité à croître sur un milieu sélectif sans interaction) ; nous avons donc dû utiliser de fortes doses de 3-amino-1,2,4-triazole (3-AT) pour éviter ces résultats d'autoactivation. Malgré cette approche, l'utilisation de MukB entier et de MukF a produit des faux positifs, même lorsque nous avons effectué un gradient de 3-AT (25 nM, 50 nM et 100 nM) sur le milieu –LUH (milieu sans les acides aminés L, U, et H). Ces interactions ne sont donc pas prises en considération **(Figure 29)**.

Malgré différentes tentatives et différentes approches, nous n'avons pas pu mettre en évidence une interaction directe entre MatP et MukBEF. En 2021, la publication sur la structure de MukBEF en combinaison avec l'ADN et MatP a révélé de nouvelles surfaces d'interaction entre les deux complexes (Bürmann et al. 2021), qui semblent contredire les publications précédentes. Dans cette analyse, MatP interagirait de manière stable par son domaine de fixation à l'ADN avec le domaine "joint" de MukB et de manière plus transitoire avec le domaine N-terminale de MukE. Reproduire le test double hybride que nous avons effectué en y incluant le domaine "joint" de MukB pourrait révéler une interaction et permettre de générer des mutants.

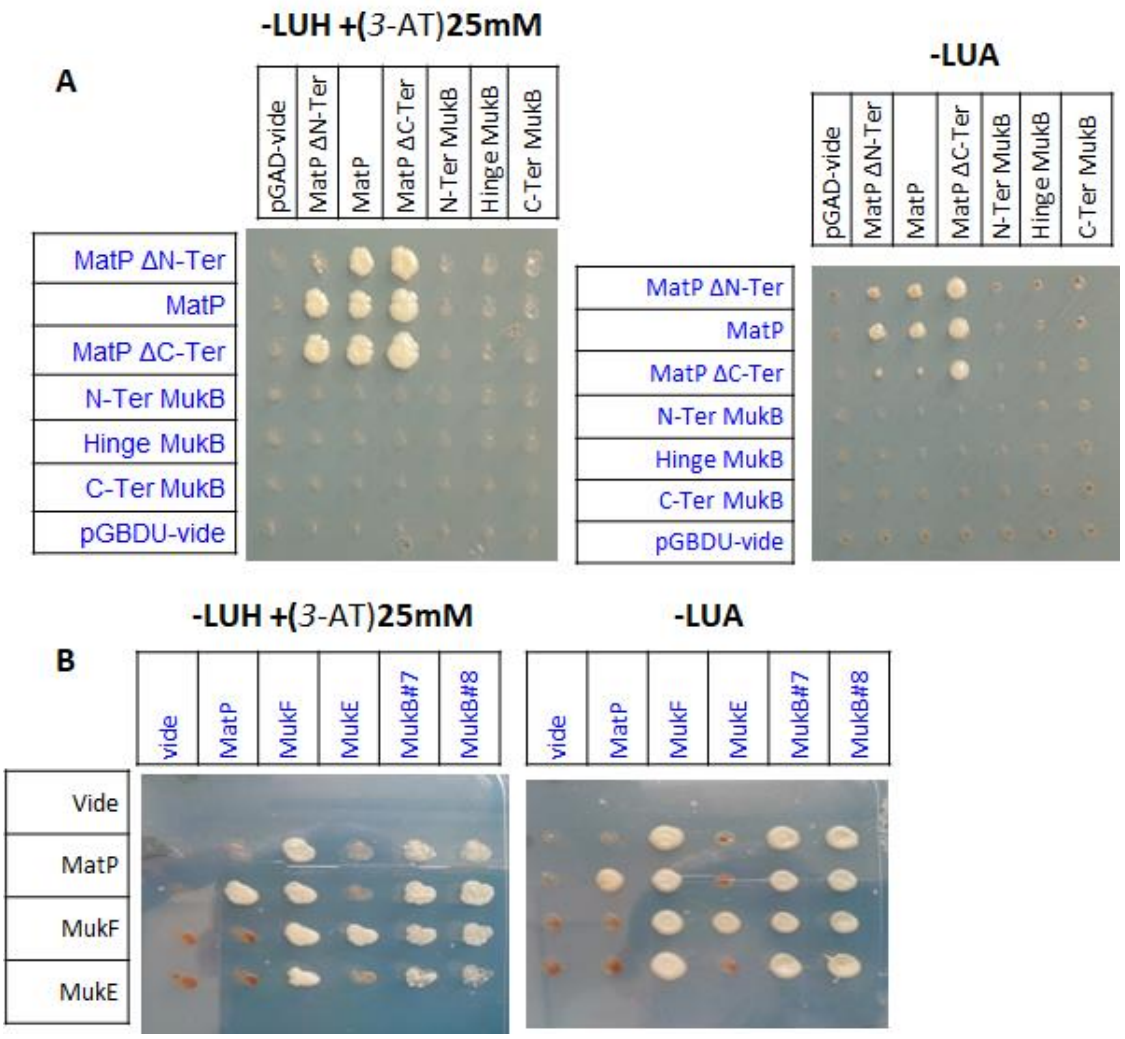


Figure 29 : Interaction physique MukBEF-MatP par double hybride chez *S. cerevisiae.* **(A)** résultats d'interaction sur les milieux sélectifs –LUA –LUH 25nM *3*-amino-1,*2*,4-*triazole* (*3*-AT), entre les protéines MatP ou des fragments de MatP (MatP ΔN-Ter et MatP ΔC-Ter), et différents fragments de MukB : MukB-N-Ter, MukB-hinge et MukB-C-Ter, **(B)** interaction séléctionnésur les mêmes milieux (A) des protéines: MatP, MukE, mukF et deux clones de MukB. Les clones #7 et #8 de MukB ont été sélectionné sur milieu sélectif d'interaction avec MatP puis réutilisée pour faire l'expérience du double hybride.

Génération des mutants ciblés d'interaction MatP-MukB

Afin de comprendre le rôle physiologique de l'inhibition de MukBEF par MatP, notre approche a consisté à générer un mutant MatP qui ne pourrait pas inhiber MukBEF tout en conservant les autres activités de MatP. Afin de générer des mutants d'interaction MatP-MukB, nous nous sommes basés sur la structure Cryo-EM du complexe MukBEF-MatP (Bürmann et al. 2021). L'interaction entre MatP et le domaine "joint" de MukB implique les AA Nter de MatP dont nous savons qu'ils sont importants pour sa capacité à fixer l'ADN (Dupaigne et al. 2012). Nous avons donc décidé de cibler l'interaction MatP-MukE. En effet, on retrouve un pontage entre le domaine N-Ter de MukE et l'hélice α2 de MatP dont nous savons qu'il peut supporter un certain nombre de mutations tout en gardant sa capacité à se fixer sur le MD Ter. Cette interaction est proposée comme étant une interaction transitoire qui pourrait déclencher le mécanisme de l'inhibition de MukBEF par MatP. Nous avons dans un premier temps utilisé le mutant MatPD42A généré précédemment au laboratoire. Puis après discussion avec Frank Bürmann, nous avons ciblé toute la surface d'interaction de MatP avec MukE et substitué les 5 AA impliqués dans cette interaction. Les expériences HiC menées sur ces deux mutants n'ont pas montré de changement dans la conformation du Ter **(Figure 31)**, ce qui indique que l'inhibition de MukBEF par MatP n'est pas affectée par ces mutations. Jusqu'à présent, nous n'avons donc pas réussi à générer de mutants d'interaction entre MukBEF et MatP.

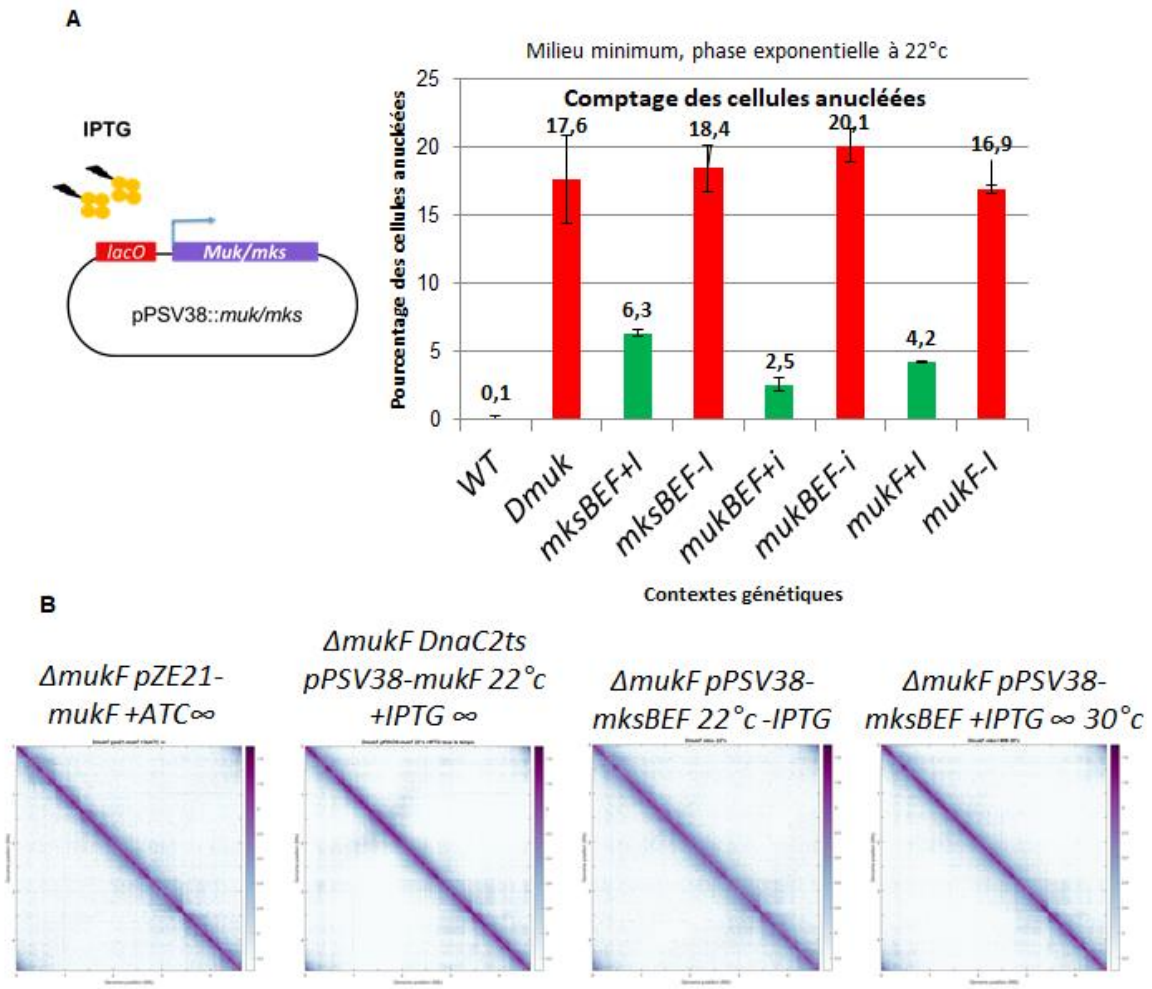


Figure 30 : Complémentation de la ségrégation et de la conformation du chromosome. (A) Comptage des cellules anucléées en milieu minimum en phase exponentielle DO=0,1-0,2 à 22°c, des souches MG1655 (WT), Δ*muk*, et des mutants *muk* complémenté par le plasmides *pPSV38-mksBEF*/*mukBEF*/*mukF* en présence et en absence d'inducteur IPTG (+I/-I), (B) Matrices normalisées 3C-seq/HiC 5Kb-bin, du mutant Δ*mukF* complémenté par le plasmide *pZE21-mukF*, *pPSV38-mukF/mksBEF*, ∞: tous le temps, MM: milieu minimum-Glucose.

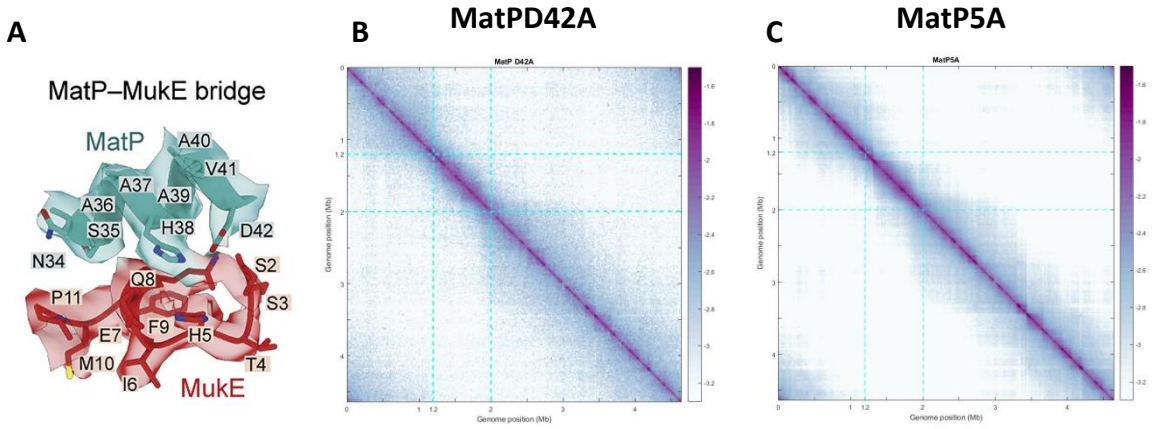


Figure 31 : Génération de mutants MatP ciblant l'interaction avec MukB.

(A) Structure Cryo-EM du domaine d'interaction entre MatP et MukE (d'après (Bürmann et al. 2021)). À partir de ces surfaces d'interaction, deux mutants ont été construits : le mutant **MatP D42A** et le mutant **MatP5A**, qui contient une substitution de 5 acides aminés entre le H38 et le D42 (MatP5A). Des matrices Hi-C normalisées en bin de 5 kb ont été générées pour les mutants **MatPD42A** (B) et **MatP5A** (C).

Trans-complémentation de *mukBEF* par *mksBEF* de *P. aeruginosa*.

MukBEF étant capable d'assurer la ségrégation du chromosome de *Pseudomonas aeruginosa* en absence de MksBEF et de générer des contacts en cis à longue distance sur ce même chromosome, nous avons voulu tester si de la même manière, MksBEF serait capable de compléter un mutant *muk*. De plus, P. aeruginosa ne disposant pas du système MatP/matS, nous avons testé si MksBEF serait résistant à l'inhibition par MatP et quelles en seraient les conséquences pour la physiologie de la cellule et la conformation du chromosome.

Nous avons utilisé le plasmide *pPSV38::mksBEF*, où *mksBEF* est sous contrôle d'un promoteur inductible à l'IPTG (construit au laboratoire pour contrôler l'expression de *mksBEF* chez *P. aeruginosa*). Ainsi, nous avons transformé ce plasmide dans une souche *ΔmukF*. Les stries de la souche *ΔmukF pPSV38::mksBEF*, en présence et en absence d'inducteur "IPTG", montre que la souche ne pousse à 37°C qu'en présence d'IPTG, ce qui indique que MksBEF restaure la croissance de la souche *ΔmukF* à 37°C. Le pourcentage de cellules anucléées en phase exponentielle de croissance en milieu minimum (glucose, casamino acides) est de 18,4% en absence d'IPTG et de 6,3% en présence d'IPTG. Étant donné que l'induction de *mukBEF* par le même système et dans les mêmes conditions montre un pourcentage de 2.5%, cela suggère que MksBEF complémentent en très grande partie le taux des cellules anucléées.

Sachant que MksBEF restaure le pourcentage des cellules anucléées et la croissance à 37°c du mutant *ΔmukF*, MksBEF représente un candidat intéressant à tester sur la conformation du chromosome, et la structuration du Ter **(Figure 30 B)**. Nous avons effectué des expériences HiC sur une souche *ΔmukF pPSV38-mksBEF* +IPTG, en milieu minimum à 30°C. Les résultats obtenus dans deux expériences différentes étaient contrastés. En raison d'un manque de temps, ces expériences n'ont pas pu être reproduites. D'autres expériences seront nécessaires pour explorer la capacité de MksBEF à générer des contacts en cis à longue distance chez *E. coli*.

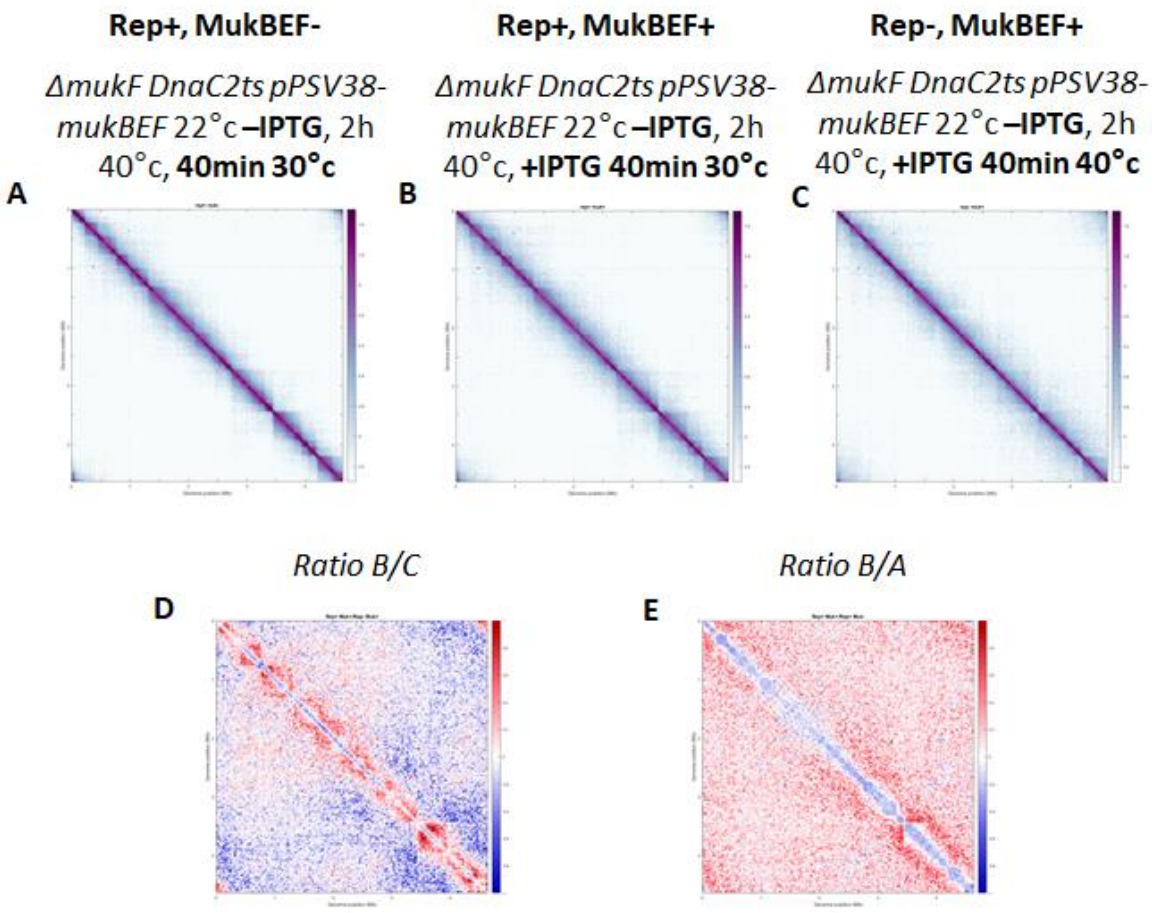


Figure 32 : La formation des contacts cis par MukBEF en cours de réplication. Matrices normalisées HiC 5Kb-bin, expériences HiC sur des populations de cellules de la souche MG 1655 *ΔmukF DnaC2ts pPSV38-mukBEF* poussée à 22°c jusqu'au phase exponentielle, puis synchronisées 2h à 40°c, **(A)** la réplication est redémarrer à 30°c pendant 40min sans induction de mukBEF, **(B)** le redémarrage de la réplication et l'induction de *mukBEF* sont effectués simultanément, pendant 40min à 30°c, **(C)** *mukBEF* est induit 40min à 40°c sans redémarrage de la réplication, **(D)** visualisation de l'effet de la réplication par le log2 du ratio (B/C), **(E)** visualisation de l'effet de l'induction de *mukBEF* en cours de réplication par le log2 ratio (B/A).

DISCUSSION

Discussion

La molécule d'ADN est le substrat de différents processus biologiques fondamentaux, tels que la transcription impliquée dans l'expression génique et la réplication nécessaire à la transmission des gènes entre les générations. Du fait de sa grande taille, la molécule d'ADN doit être compactée efficacement pour entrer dans une cellule 1000 fois plus petite, tout en restant fonctionnelle pour un ensemble de processus biologiques essentiels. Parmi les principaux acteurs de cette condensation présents chez la plupart des êtres vivants, les complexes SMCs jouent un rôle essentiel. Chez les bactéries, les complexes SMCs participent à la ségrégation et à la condensation/conformation du chromosome. Ainsi, leurs activités passent par quatre étapes : le chargement, la condensation du chromosome (par un mécanisme encore en discussion), la translocation et le déchargement.

Au cours de ma thèse, nous avons étudié la condensine bactérienne MukBEF, et examiné les différentes étapes de son activité de conformation sur le chromosome.

Le chargement de MukBEF sur le chromosome : un chargement sans sites spécifiques

Jusqu'à présent, les modèles de chargement des complexes SMC chez les eucaryotes et les procaryotes impliquaient un processus qui nécessite un chargeur spécifique, comme TFIIIC pour la condensine eucaryote, le complexe SCC2-SCC4 pour la cohésine eucaryote, et ParB pour la condensine bactérienne Smc-ScpAB. Par conséquent, ces complexes SMC sont chargés sur des sites déterminés du chromosome qui sont reconnus par les chargeurs de ces complexes. En conséquence, il est possible de prédire, de déplacer ou même d'empêcher le chargement de ces complexes en supprimant ces séquences, comme cela a été montré pour le déplacement du chargement de Smc-ScpAB en déplaçant les sites parS en présence de ParB chez *B. subtilis*.
Chez *E. coli* nous avons montré que l'induction de MukBEF entraîne une augmentation des contacts de longue distance sur tout le chromosome, en dehors du Ter ; ces contacts atteignent leur longueur maximale après deux heures d'induction de MukBEF. Étant donné que les contacts de longue distance ne se propagent pas à partir d'un site spécifique, cela suggère que le mode de chargement de MukBEF est différent de celui de Smc-ScpAB. Par conséquent, deux scénarios possibles pour le chargement de MukBEF peuvent être imaginés : un chargement

spécifique sur de nombreux sites du chromosome, ou un chargement aléatoire qui ne se fait pas sur des sites déterminés du chromosome mais de manière "stochastique".

Le mécanisme moléculaire de chargement de MukBEF sur l'ADN n'a pas été étudié durant ma thèse et la question de la nécessité d'un chargeur spécifique reste sans réponse. Cependant, il est intéressant de noter que les gènes *mukBEF* sont co-occurrents d'un groupe de gènes, associé à la méthyltransférase Dam et présent chez g-protéobactéries. Le groupe de gènes co-occurrents comprend notamment *matP*, qui régule l'activité de MukBEF dans le domaine Ter. Toutefois, il existe également plusieurs gènes aux fonctions inconnues qui pourraient contribuer à la régulation du chargement de MukBEF. Néanmoins, la littérature n'a pas signalé de phénotype *muk*- associé à l'inactivation d'un de ces gènes.

Chez *P. aeruginosa*, l'expression de *mukBEF* d'*E. coli* complémente la ségrégation en l'absence de *parB* et *mksBEF* et génère des contacts à longue distance visibles en 3C-seq. Cela suggère que si un facteur de chargement de *mukBEF* est nécessaire, il est présent à la fois chez *E. coli* et *P. aeruginosa*, sans faire partie des gènes ayant co-évolué avec *mukBEF* et *dam* puisque *P. aeruginosa* ne fait pas partie de ce groupe d'espèces. Une seconde hypothèse serait que MukBEF n'a pas besoin d'un facteur supplémentaire pour se charger sur l'ADN. Il est à noter que le fait que le complexe de MukBEF-MatP-AcpP ait pu être formé avec l'ADN *in vitro* sans protéines additionnelles renforce cette dernière hypothèse.

Les techniques de microscopie à haute résolution et de biochimie ont suggéré que 30% des complexes MukBEF se présentent sous forme de dimères de dimères *in vivo*. Cette multimérisation de MukBEF via la kléisine (MukF) n'est pas observée chez les autres complexes SMC. Des études ont également suggéré que le mutant de dimérisation MukF présente un phénotype *muk*-, mais ce point particulier est toujours en discussion et la fonction biologique éventuelle de cette multimérisation n'est pas encore éclaircie. Étant donné que nous n'avons pas identifié de chargeur spécifique, il est plausible que le mécanisme de chargement de MukBEF ne nécessite pas de chargeur, contrairement aux autres complexes SMCs, mais qu'il tire parti de sa capacité à former un dimère de dimère pour se charger sur le chromosome. De plus, selon les observations microscopiques, le focus immobile de MukBEF est composé de 8 à 10 dimères de dimères, et la structure Cryo-EM de MukBEF ne présente pas cette conformation, ce qui pourrait suggérer que cette forme multimérique de MukBEF soit transitoire et ne permette que de charger la condensine.

Cette hypothèse pourrait expliquer l'absence d'un chargeur connu spécifique pour MukBEF, ainsi que le fait que son chargement soit non spécifique quant au site, étant donné que MukBEF ne présente aucune spécificité d'interaction avec l'ADN.

L'activité de MukBEF

L'activité de conformation de MukBEF consiste à promouvoir des contacts à longue distance en dehors du Ter, qui dépasse les 800 Kb pour certaines zones du chromosome. Les expériences d'induction de MukBEF dans des cellules non synchronisées à 22°C, montrent une augmentation progressive au cours du temps sur tout le chromosome en dehors du Ter ; cette augmentation de la portée des contacts ne détruit pas les structures faites par la transcription (CIDs), mais atténue l'effet séparateur des bordures et instaure une perméabilité entres les différentes régions du chromosome. En effet, l'orientation des contacts de chaque locus ne change pas en présence de MukBEF, mais la portée des contacts augmente.

Mon projet de thèse a permis de caractériser l'activité de formation des contacts en *cis* à longue distance, en fonction du temps dans une population de cellules non synchronisées, et en fonction de la réplication dans une population de cellules synchronisées. La formation de ces contacts par MukBEF se fait progressivement au cours du temps, pour atteindre un niveau maximal après 2h d'induction. De façon surprenante, l'induction continue de MukBEF pendant plus de deux heures diminue la portée de ces contacts. Ce phénotype probablement dû à une surproduction de la condensine est cohérent avec le modèle proposé concernant la distribution des complexes MukBEF le long de l'ADN observé par microscopie, qui suggère que lors de la surexpression de MukBEF, la structure axiale serait plus dense et les boucles formées auraient une taille plus courte que dans les conditions WT (Mäkelä et Sherratt 2020).

MukBEF est capable de former des contacts à longue distance lors de la réplication et en absence de réplication. De plus, les contacts à longue distance formés par MukBEF ne modifient ni l'orientation des contacts, ni les domaines d'interaction chromosomique délimités par la transcription génique. Ces observations sur les contacts formés par MukBEF suggèrent que l'activité de cette condensine bactérienne n'est pas affectée par la réplication ou la transcription, contrairement à ce qui a été observé pour Smc-ScpAB chez *B. subtilis*. Cette capacité de MukBEF à s'affranchir des obstacles pourrait être due à sa capacité à se charger de manière stochastique sur le chromosome, permettant ainsi à MukBEF de rétablir son activité sur le chromosome après le passage de la fourche de réplication et de chaque côté d'une barrière de transcription.

MukBEF joue un rôle dans la ségrégation et la formation de contacts en *cis* à longue distance, que l'on peut considérer comme un rôle de conformation du chromosome. Cependant, est-ce que cette activité participe à la ségrégation des chromosomes ?

Nous avons montré que la ségrégation est restaurée lors de la complémentation de *ΔmukF* par la surexpression de *mukF* ou *mksBEF*, sans effet sur les contacts à longue distance qui restent inchangés (comme dans une souche *ΔmukF*). Cela montre que les contacts de longue distance ne sont pas essentiels à la ségrégation dans les conditions expérimentales. Néanmoins, nous ne pouvons pas exclure que l'activité de MukBEF dans la "formation de contacts à longue distance" ne soit pas nécessaire dans des conditions de compétition ou des conditions plus sélectives de la nature.

On peut également noter que, bien que la croissance des souches *ΔmukF* complémentées par *mukF* seul ou *mksBEF* soit parfaitement restaurée sur milieu riche, un taux de cellules anucléées légèrement plus élevé est observé dans ces deux conditions, en comparaison de la complémentation par l'opéron entier *mukBEF* capable d'induire ces contacts à longue distance. L'apparition de ces contacts à longue distance pourrait donc être le marqueur d'une activité optimale de la condensine.

De même, chez d'autres espèces bactériennes, l'effet des condensines sur la conformation semble être dissocié de leur impact sur la ségrégation. Par exemple, chez *B. subtilis*, SMC-ScpAB a un fort impact sur la conformation du chromosome en alignant les bras à partir des sites *parS*, mais cette activité n'est pas clairement associée à sa capacité de ségréger le chromosome. En effet, la délétion de *parB* ou de *parS*, bien qu'elle transforme la conformation du chromosome, n'a qu'un effet extrêmement marginal sur la ségrégation.

Des observations similaires ont également été faites chez *P. aeruginosa* lors de la délétion de *parA*, où la ségrégation est assurée par MksBEF, même si ce dernier ne peut pas introduire des contacts à longue distance en *cis* sur le chromosome en raison de la présence de Smc-ScpAB.

Nous mesurons l'activité des condensines en nous basant sur l'effet qu'elles produisent sur la conformation du chromosome, mais nous devons rester conscients que cette méthode de mesure ne reflète qu'une activité alors que ces complexes pourraient agir sur différents aspects de l'organisation des chromosomes.

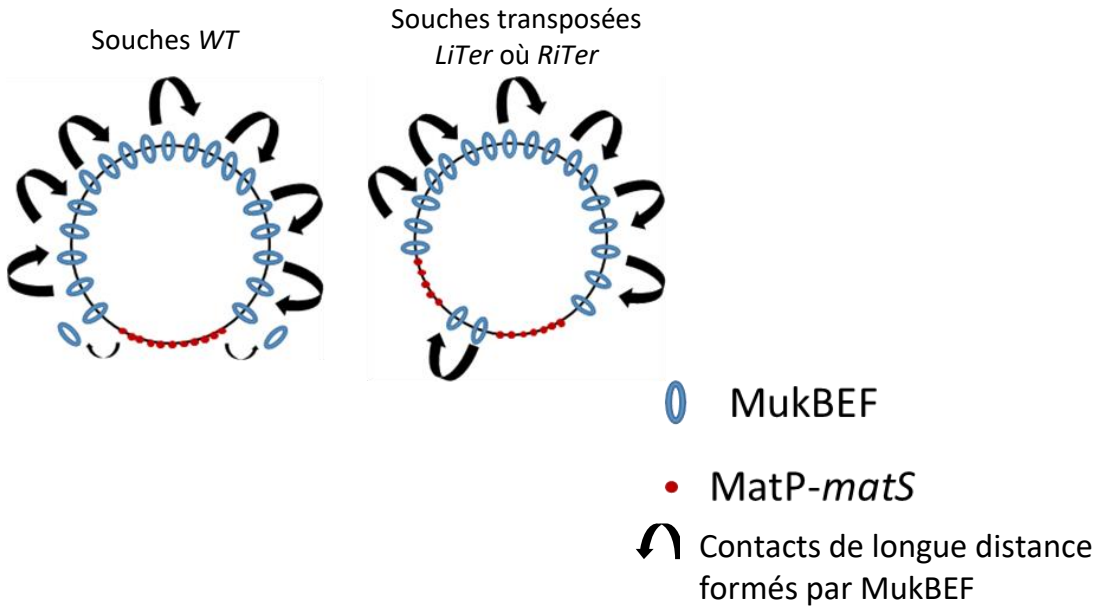


Figure 33 : Schéma représentatif des contacts formés par MukBEF après induction

Interconnexion entre la réplication et la conformation du chromosome

D'une manière intéressante chez *E. coli* la réplication augmente d'un facteur 2 à 4 l'enrichissement de la condensine bactérienne MukBEF sur le chromosome. En effet plusieurs expériences de Chip-seq réalisés sur des cellules synchronisées ont mis en évidence un enrichissement de MukB sur les zones néo-répliquées. Afin de déterminer si cet enrichissement est associé à la fourche de réplication, nous avons tenté d'induire un seul évènement de réplication. Pour ce faire, apres un arret de replication de 2H à 40°C, nous avons induit la prelication en placant les cellules à 30°C pendant 15mn puis essayer d'empecher tous nouveau round d'initiation en les replaceant pendant 30mn à 40°C. Malheureusement si l'inactivation de la réplication dans une souche *dnaC*^{ts} est total après un passage de deux heures à 40°C, cela n'est pas le cas après 30 min et nous avons pu observé des evenements de replication surnumerrere. Nous ne pouvons donc distinguer en l'état si MukBEF est enrichi au niveau de la fourche de réplication et est donc associé à sa progression ou si cet enrichissement apparait sur l'ensemble de la zone répliquée. Nous avons également cherché à comprendre si l'activité de MukBEF est modulée par la réplication et pour ce faire, nous avons réalisé des expériences de capture de conformation du chromosome (3C-seq/HiC) dans les mêmes conditions que celles de l'analyse ChIP-seq de MukB, à savoir dans une souche *dnaC2*^{ts} dans un contexte sauvage pour *mukBEF*, afin de synchroniser les cellules et de travailler avec une concentration physiologique de MukBEF. Si la réplication entraîne un enrichissement de MukBEF, le blocage de la réplication pendant une longue période pourrait influencer le turnover de MukBEF sur le chromosome, réduisant ainsi les contacts à longue distance sur le chromosome en raison de la baisse de la concentration de la condensine associée au chromosome. Nous avons constaté que, après 3 heures de blocage de la réplication à 40°C, les contacts à longue distance sur le chromosome étaient toujours présents, ce qui n'a pas permis de détecter une différence significative dans la formation des contacts après le redémarrage de la réplication. Ces résultats démontrent que MukBEF reste associé à l'ADN en l'absence de réplication ; un éventuel turn-over des complexes sur l'ADN reste à être caractérisé.

La capacité de MukBEF à introduire les contacts en *cis* à longue distance a également été testée sur un chromosome qui ne se réplique pas. Pour ce faire, nous avons utilisé notre système d'induction de MukBEF à l'IPTG, dans un contexte *ΔmukF dnaC2ts* qui permet de bloquer la réplication en absence de contacts à longue distance. Cela nous a permis d'induire MukBEF en l'absence de réplication pendant une heure à 40°C. Les résultats obtenus montrent que des contacts en cis à longue distance sont formés par MukBEF après une induction de deux heures

à 40°C sur un chromosome *muk*- qui ne se réplique pas. Ainsi, MukBEF est capable de se charger et de former des contacts à longue distance sur un chromosome qui ne se réplique pas. Afin de déterminer si MukBEF pourrait être préférentiellement chargé à la fourche de réplication, nous avons induit MukBEF concomitamment au redémarrage de la réplication. Ici le redémarrage de la réplication est effectué par le passage à 30°c pendant 40min. Le résultat obtenu ne montre pas une augmentation des contacts en cis à longue distance localisée au niveau des régions répliquées ; en effet, le résultat obtenu ne montre pas une différence significative avec celui obtennu après induction de MukBEF 40 min en arrêt de réplication. De façon surprenante, l'induction de *mukBEF* pendant 40 min dans des cellules qui redémarrent la réplication ne se traduit pas par l'apparition de contacts à longue distance. Ce résultat inattendu suggère que dans ces conditions, notre système d'induction est moins efficace qu'avec des cellules en croissance exponentielle. Alternativement, on pourrait imaginer que les complexes MukBEF associés à la fourche de réplication participe à un processus différent comme par exemple la décantation, par exemple en association avec Topo IV pour séparer des chromatides sœurs.

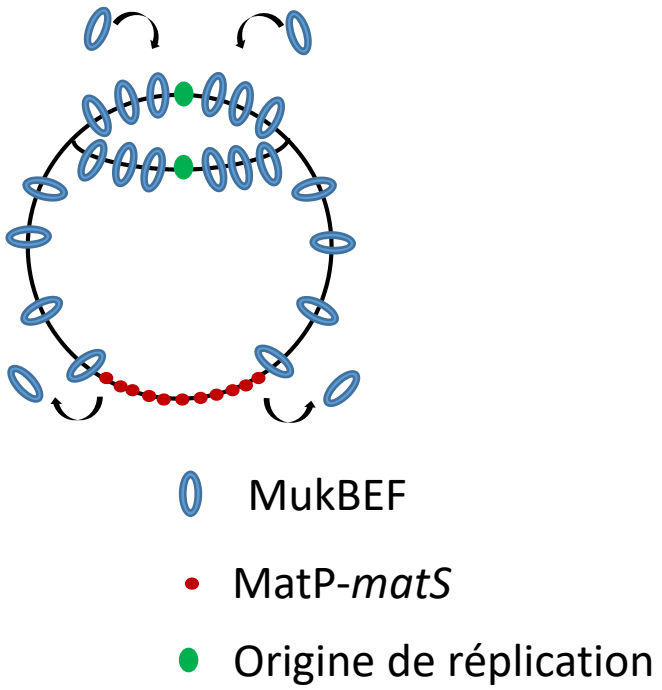


Figure 34 : Schéma représentatif du chargement de MukBEF sur le chromosome, en présence de la réplication.

Déchargement de MukBEF du chromosome

La condensine bactérienne MukBEF est inhibée par le système MatP/*matS* au niveau de la région Ter. En réalisant plusieurs expériences de ChIP-seq contre MatP, nous avons redéfini la cartographie des sites *matS* chez *E. coli*. Ainsi, 28 *sites matS* répartis sur les 800 kb de la région Ter ont été identifiés. L'analyse de la distribution des sites *matS* montre que le site *dif* se situe au milieu de la région contenant les sites *matS* et que l'espacement entre les sites *matS* diminue en s'approchant du *site dif*. Après avoir identifié les sites *matS* et leur distribution dans le chromosome d'une quinzaine d'entérobactéries, nous avons pu généraliser ces observations même si la taille des régions Ter et le nombre de sites *matS* varient, indépendamment de la taille du chromosome. Étant donné que le chargement de MukBEF est stochastique sur le chromosome, ces analyses sur le positionnement des sites *matS* suggèrent que le système MatP/*matS* a pour rôle d'empêcher le chargement de MukBEF à proximité du site *dif*. Néanmoins, l'intérêt physiologique de cette inhibition n'est pas clairement établi.

La délétion de *matP* n'a pas un effet fort sur la physiologie de la cellule. Toutefois, la chorégraphie du chromosome change, et les régions Ter se séparent plus rapidement ; en effet, MatP joue un rôle de fixation du MD Ter sur le septum de division. L'inhibition de MukBEF ne résulte pas de la fixation de MatP sur le septum puisque les mutants matPΔC20 et *ΔZapB* qui abolissent la liaison du Ter au septum, inhibent toujours l'action de MukBEF. Ces résultats suggèrent que l'inhibition de MukBEF passe par l'interaction direct du dimère de MatP avec la condensine.

Il était tentant d'imaginer que MatP pouvait former des tétramères *in vivo* grâce à son domaine C-terminal, créant ainsi un pontage entre deux sites *matS* sur un même chromosome. Cependant, l'analyse des résultats HiC obtenus sur une souche d'*E. coli* de type sauvage n'a pas permis de confirmer ce modèle d'interactions entre sites *matS*. En revanche, il est possible que MatP forme un pontage entre deux sites *matS* de deux chromosomes différents, en particulier chez les bactéries qui possèdent deux chromosomes, telles que *V. cholerae*. Cette hypothèse est intéressante car elle permettrait de maintenir une colocalisation des régions Ter de plusieurs chromosomes sans avoir recours à la fixation sur le septum de division.

Les résultats de 3C-seq sur la souche issue de la transposition de 450 kb du MD Right dans le Ter a permis d'observer des contacts à longue distance, dépendants de MukBEF, qui apparaissent sur les séquences transposées. Cette transposition divise le Ter en deux segments de 400 kb et de 500 kb de Ter, qui contiennent respectivement 11 et 17 sites *matS*. De manière

remarquable, ces deux segments conservent une conformation similaire à celle du MD Ter. Cela suggère que l'effet inhibiteur du système MatP/*matS* repose sur une succession d'un certain nombre de sites *matS* plutôt que sur la formation d'un ensemble de 28 sites consécutifs.

Pour examiner l'effet du nombre et de la densité des sites *matS* sur l'inhibition de l'activité de MukBEF, nous avons réalisé une série de transpositions permettant d'isoler des fragments de Ter présentant des nombres et une densité de sites *matS* différents. Les résultats obtenus montrent que MukBEF arrive à former des contacts d'une portée maximale dans les séquences transposées, ce qui souligne sa capacité à se charger manière stochastique sur l'ADN.

La mesure des portées des contacts dans une souche sauvage montre que les contacts formés par MukBEF diminuent rapidement, à environ 300 kb avant le premier site *matS* dans les bordures du MD Ter. Toutefois, les bordures artificiellement créées par transposition induisent une diminution des contacts à des distances plus courtes, à environ 150 kb des premiers sites *matS*. Cela indique que les bordures artificielles issues de la transposition sont moins inhibitrices de la formation des contacts par MukBEF.

Les approches de capture de conformation de chromosome sur l'ensemble des souches présentant un Ter divisé en deux sous domaines ont montré que quel que soit le nombre de sites *matS* (de 13 à 4), ces segments de Ter sont capables d'inhiber la capacité de MukBEF à former des interactions à longue distance bien que séparés de la région terminale du chromosome. De manière intéressante, la force de cette inhibition varie en fonction du nombre de sites *matS*. Ainsi, lorsque le nombre de *sites matS* est supérieur à 7 (9, 13 ou 15), la mesure de la portée des contacts sur cette seconde région de Ter ne montre pas de différence significative avec le Ter non transposé (275 +/- 9 kb). Cependant, à partir de 7 *sites matS*, la réduction du nombre de *sites matS* commence à avoir un effet sur la portée des contacts (330 +/- 9 kb). Ainsi, dans un fragment de Ter d'environ 185 kb qui contient 4 *sites matS*, la portée des contacts est de 352 +/- 12 kb, ce qui est toujours significativement différent du mutant *matP* (par exemple, Ter2 LiTer4 *ΔmatP* ;423 +/- 13 kb), mais présente des contacts plus distants que les souches dont les transpositions impliquent davantage de sites *matS*.

Par la suite, nous avons décidé d'effectuer des expériences sur le nombre et la densité des *sites matS* à partir de la souche LiTer4 ("Left in Ter 4 *matS* sites"). Dans cette souche, nous avons délété soit *matS26*, soit *matS28*, pour générer deux souches LiTer(4-1) avec une distribution différente de sites *matS* ; la suppression de *matS28* laisse une région Ter où les trois *sites matS* sont concentrés sur 78 kb, alors que la suppression de *matS26* induit une dispersion des trois sites *matS* sur 136 kb. Les résultats ont montré que la portée des contacts est plus longue avec

trois sites *matS*, ce qui montre que le nombre de *sites matS* est important pour l'inhibition de MukBEF. La distribution dispersée (LiTer4 *ΔmatS26*) des *sites matS* présente une étendue de contacts supérieure à 370 +/- 15 kb par rapport à la distribution plus resserrée des sites *matS* dans la souche LiTer4 *ΔmatS28* (357 +/- 28 kb). Ce résultat indique que l'inhibition de MukBEF se produit plus efficacement pour une région donnée lorsque la densité de sites *matS* est plus forte. Néanmoins, il est à noter que ces différences sont faibles et que nous sommes limités par la résolution de l'approche HiC.

L'inhibition par le système MatP/*matS* de la formation des contacts à longue distance par MukBEF est un mécanisme qui s'effectue de manière progressive et cumulative. Nous avons noté que la distribution des sites *matS* dans un MD Ter d'une souche wt, on retrouve souvent une densité de sites *matS* plus importante à proximité du *site dif* que dans les bordures du Ter. Les résultats obtenus jusqu'à présent suggèrent comme prérequis minimum pour l'inhibition de MukBEF un minimum de 3 *sites matS* rapprochés les uns des autres (distances moyennes entre les *sites matS* de 30 kb) pour décharger la condensine du chromosome.

L'analyse des résultats de ChIP-seq de MukB-tag a montré que l'enrichissement de MukB diminue fortement à 250 kb avant le MD Ter. Un résultat similaire est obtenu dans la souche transposée LiTer*7* à la bordure du segment Ter transposé au milieu du réplichore gauche. Cet effet à distance suggère que le mécanisme d'inhibition de MukBEF par MatP consiste à décharger ce dernier du chromosome, alors que MukBEF est engagé dans son activité de condensine au sein et rencontre des sites *matS*.

Le mécanisme de déchargement de MukBEF est contraint par le mode de chargement de cette condensine sur l'ADN. En effet, sa capacité à se charger sur le chromosome à des sites multiples limite les stratégies possibles pour inhiber son activité, qui repose sur une succession de complexes de déchargement qui recouvrent l'ensemble de la zone à "protéger". Dans le cas de SMC-ScpAB chargé en une région du chromosome (définie par les sites *parS*), son déchargement ne nécessite qu'une série de sites *XDS*. En effet, l'insertion d'une cassette de 12 sites *XDS* consécutifs sur un seul réplichore provoque le déchargement de la condensine, et abolit son action en aval de la cassette. MukBEF au contraire peut se recharger sur les séquences transposées après son déchargement dans les segments du Ter. Il convient de noter que le mécanisme moléculaire de déchargement de MukBEF par MatP/*matS* ou de Smc-ScpAB par XerD/*XDS* n'a pas été décrit jusqu'à présent.

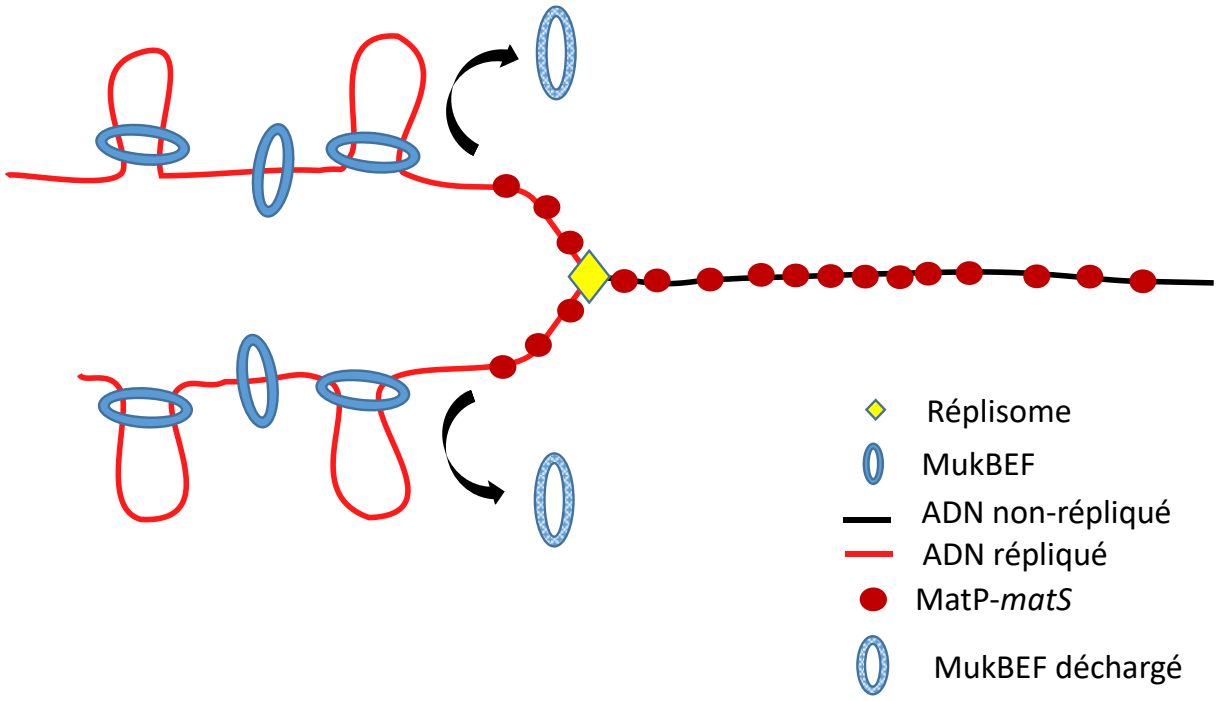


Figure 35 : Schéma représentatif de la distribution de MukBEF dans le Ter lors de sa réplication

Références bibliographiques

Adam, Yazid, Pierre Brezellec, Elena Espinosa, Amelie Besombes, Delphine Naquin, Evelyne Paly, Christophe Possoz, Erwin van Dijk, Francois-Xavier Barre, et Jean-Luc Ferat. 2022. « Plesiomonas shigelloides, an Atypical Enterobacterales with a Vibrio-related secondary chromosome ». *Genome biology and evolution* 14 (2): evac011.

Anchimiuk, Anna, Virginia S. Lioy, Florian Patrick Bock, Anita Minnen, Frederic Boccard, et Stephan Gruber. 2021. « A low Smc flux avoids collisions and facilitates chromosome organization in Bacillus subtilis ». *Elife* 10: e65467.

Anderson, David E., Ana Losada, Harold P. Erickson, et Tatsuya Hirano. 2002. « Condensin and cohesin display different arm conformations with characteristic hinge angles ». *The Journal of cell biology* 156 (3): 419-24.

Badrinarayanan, Anjana, Rodrigo Reyes-Lamothe, Stephan Uphoff, Mark C. Leake, et David J. Sherratt. 2012. « In vivo architecture and action of bacterial structural maintenance of chromosome proteins ». *Science* 338 (6106): 528-31.

Bahng, Soon, Rupesh Kumar, et Kenneth J. Marians. 2022. « Intersubunit and intrasubunit interactions driving the MukBEF ATPase ». *Journal of Biological Chemistry* 298 (6).

Bailey, Matthew W., Paola Bisicchia, Boyd T. Warren, David J. Sherratt, et Jaan Männik. 2014. « Evidence for Divisome Localization Mechanisms Independent of the Min System and SlmA in Escherichia Coli ». *PLOS Genetics* 10 (8): e1004504. https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004504.

Banigan, Edward J., Aafke A. van den Berg, Hugo B. Brandão, John F. Marko, et Leonid A. Mirny. 2020. « Chromosome organization by one-sided and two-sided loop extrusion ». *Elife* 9: e53558.

Bates, David, et Nancy Kleckner. 2005. « Chromosome and replisome dynamics in E. coli: loss of sister cohesion triggers global chromosome movement and mediates chromosome segregation ». *Cell* 121 (6): 899-911.

Bazile, Franck, Julie St-Pierre, et Damien D'Amours. 2010. « Three-step model for condensin activation during mitotic chromosome condensation ». *Cell Cycle* 9 (16): 3263-75.

Beagan, Jonathan A., et Jennifer E. Phillips-Cremins. 2020. « On the existence and functionality of topologically associating domains ». *Nature genetics* 52 (1): 8-16.

Bock, Florian P., Hon Wing Liu, Anna Anchimiuk, Marie-Laure Diebold-Durand, et Stephan Gruber. 2022. « A joint-ParB interface promotes Smc DNA recruitment ». *Cell Reports* 40 (9): 111273.

Böhm, Kati, Giacomo Giacomelli, Andreas Schmidt, Axel Imhof, Romain Koszul, Martial Marbouty, et Marc Bramkamp. 2020. « Chromosome organization by a conserved condensin-ParB system in the actinobacterium Corynebacterium glutamicum ». *Nature communications* 11 (1): 1-17.

Brandão, Hugo B., Zhongqing Ren, Xheni Karaboja, Leonid A. Mirny, et Xindan Wang. 2021. « DNA-loop-extruding SMC complexes can traverse one another in vivo ». *Nature structural & molecular biology* 28 (8): 642-51.

Brézellec, Pierre, Mark Hoebeke, Marie-Sophie Hiet, Sophie Pasek, et Jean-Luc Ferat. 2006. « DomainSieve: a protein domain-based screen that led to the identification of dam-associated genes with potential link to DNA maintenance ». *Bioinformatics* 22 (16): 1935-41.

Brieño-Enríquez, Miguel A., Stefannie L. Moak, Melissa Toledo, Joshua J. Filter, Stephen Gray, José L. Barbero, Paula E. Cohen, et J. Kim Holloway. 2016. « Cohesin removal along the chromosome arms during the first meiotic division depends on a NEK1-PP1γ-WAPL axis in the mouse ». *Cell reports* 17 (4): 977-86.

Britton, Robert A., Daniel Chi-Hong Lin, et Alan D. Grossman. 1998. « Characterization of a prokaryotic SMC protein involved in chromosome partitioning ». *Genes & development* 12 (9): 1254-59.

Bürmann, Frank, Alrun Basfeld, Roberto Vazquez Nunez, Marie-Laure Diebold-Durand, Larissa Wilhelm, et Stephan Gruber. 2017. « Tuned SMC arms drive chromosomal loading of prokaryotic condensin ». *Molecular cell* 65 (5): 861-872. e9.

Bürmann, Frank, Louise FH Funke, Jason W. Chin, et Jan Löwe. 2021. « Cryo-EM structure of MukBEF reveals DNA loop entrapment at chromosomal unloading sites ». *Molecular cell* 81 (23): 4891-4906. e8.

Bürmann, Frank, Byung-Gil Lee, Thane Than, Ludwig Sinn, Francis J. O'Reilly, Stanislau Yatskevich, Juri Rappsilber, Bin Hu, Kim Nasmyth, et Jan Löwe. 2019. « A folded conformation of MukBEF and cohesin ». *Nature structural & molecular biology* 26 (3): 227-36.

Buss, Jackson A., Nick T. Peters, Jie Xiao, et Thomas G. Bernhardt. 2017. « ZapA and ZapB form an FtsZ-independent structure at midcell ». *Molecular microbiology* 104 (4): 652-63. https://doi.org/10.1111/mmi.13655.

Busslinger, Georg A., Roman R. Stocsits, Petra Van Der Lelij, Elin Axelsson, Antonio Tedeschi, Niels Galjart, et Jan-Michael Peters. 2017. « Cohesin is positioned in mammalian genomes by transcription, CTCF and Wapl ». *Nature* 544 (7651): 503-7.

Casjens, Sherwood. 1998. « The diverse and dynamic structure of bacterial genomes ». *Annual review of genetics* 32 (1): 339-77.

Clarkson, Christopher T., Emma A. Deeks, Ralph Samarista, Hulkar Mamayusupova, Victor B. Zhurkin, et Vladimir B. Teif. 2019. « CTCF-dependent chromatin boundaries formed by asymmetric nucleosome arrays with decreased linker length ». *Nucleic acids research* 47 (21): 11181-96.

Cobbe, Neville, et Margarete MS Heck. 2004. « The evolution of SMC proteins: phylogenetic analysis and structural implications ». *Molecular biology and evolution* 21 (2): 332-47.

Conin, Brenna, Ingrid Billault-Chaumartin, Hafez El Sayyed, Nicole Quenech'Du, Charlotte Cockram, Romain Koszul, et Olivier Espéli. 2022. « Extended sister-chromosome catenation leads to massive reorganization of the E. coli genome ». *Nucleic acids research* 50 (5): 2635-50.

Crozat, Estelle, Catherine Tardin, Maya Salhi, Philippe Rousseau, Armand Lablaine, Tommaso Bertoni, David Holcman, Bianca Sclavi, Pietro Cicuta, et François Cornet. 2020. « Post-replicative pairing of sister ter regions in Escherichia coli involves multiple activities of MatP ». *Nature communications* 11 (1): 1-12.

Cui, Tailin, Naoki Moro-oka, Katsufumi Ohsumi, Kenichi Kodama, Taku Ohshima, Naotake Ogasawara, Hirotada Mori, Barry Wanner, Hironori Niki, et Takashi Horiuchi. 2007. « Escherichia coli with a linear genome ». *EMBO reports* 8 (2): 181-87.

David, Ariane, Gaëlle Demarre, Leila Muresan, Evelyne Paly, François-Xavier Barre, et Christophe Possoz. 2014. « The two Cis-acting sites, parS1 and oriC1, contribute to the longitudinal organisation of Vibrio cholerae chromosome I ». *PLoS genetics* 10 (7): e1004448.

Davidson, Iain F., Benedikt Bauer, Daniela Goetz, Wen Tang, Gordana Wutz, et Jan-Michael Peters. 2019. « DNA loop extrusion by human cohesin ». *Science* 366 (6471): 1338-45.

Davidson, Iain F., et Jan-Michael Peters. 2021. « Genome folding through loop extrusion by SMC complexes ». *Nature reviews Molecular cell biology* 22 (7): 445-64.

Deghorain, Marie, Carine Pagès, Jean-Christophe Meile, Mathieu Stouf, Hervé Capiaux, Romain Mercier, Christian Lesterlin, Bernard Hallet, et François Cornet. 2011. « A Defined Terminal Region of the E. Coli Chromosome Shows Late Segregation and High

FtsK Activity ». Édité par Martin G. Marinus. *PLoS ONE* 6 (7): e22164. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0022164.

Demarre, Gaëlle, Elisa Galli, Leila Muresan, Evelyne Paly, Ariane David, Christophe Possoz, et François-Xavier Barre. 2014. « Differential management of the replication terminus regions of the two Vibrio cholerae chromosomes during cell division ». *PLoS genetics* 10 (9): e1004557.

Doughty, Tyler W., Heather E. Arsenault, et Jennifer A. Benanti. 2016. « Levels of Ycg1 limit condensin function during the cell cycle ». *PLoS genetics* 12 (7): e1006216.

Duigou, Stéphane, et Frédéric Boccard. 2017. « Long range chromosome organization in Escherichia coli: The position of the replication origin defines the non-structured regions and the Right and Left macrodomains ». *PLoS genetics* 13 (5): e1006758.

Dupaigne, Pauline, Nam K. Tonthat, Olivier Espéli, Travis Whitfill, Frédéric Boccard, et Maria A. Schumacher. 2012. « Molecular basis for a protein-mediated DNA-bridging mechanism that functions in condensation of the E. coli chromosome ». *Molecular cell* 48 (4): 560-71.

Eskeland, Ragnhild, Martin Leeb, Graeme R. Grimes, Clémence Kress, Shelagh Boyle, Duncan Sproul, Nick Gilbert, Yuhong Fan, Arthur I. Skoultchi, et Anton Wutz. 2010. « Ring1B compacts chromatin structure and represses gene expression independent of histone ubiquitination ». *Molecular cell* 38 (3): 452-64.

Esnault, Emilie, Michèle Valens, Olivier Espéli, et Frédéric Boccard. 2007. « Chromosome structuring limits genome plasticity in Escherichia coli ». *PLoS genetics* 3 (12): e226.

Espéli, Olivier, Romain Borne, Pauline Dupaigne, Axel Thiel, Emmanuelle Gigant, Romain Mercier, et Frédéric Boccard. 2012. « A MatP–divisome interaction coordinates chromosome segregation with cell division in E. coli ». *The EMBO journal* 31 (14): 3198-3211.

Espeli, Olivier, Romain Mercier, et Frédéric Boccard. 2008. « DNA dynamics vary according to macrodomain topography in the E. coli chromosome ». *Molecular microbiology* 68 (6): 1418-27.

Espinosa, Elena, François-Xavier Barre, et Elisa Galli. 2017. « Coordination between replication, segregation and cell division in multi-chromosomal bacteria: lessons from Vibrio cholerae ». *Int. Microbiol* 20: 121-29.

Fisher, Gemma LM, Jani R. Bolla, Karthik V. Rajasekar, Jarno Mäkelä, Rachel Baker, Man Zhou, Josh P. Prince, Mathew Stracy, Carol V. Robinson, et Lidia K. Arciszewska. 2021. « Competitive binding of MatP and topoisomerase IV to the MukB hinge domain ». *Elife* 10: e70444.

Fisher, Jay K., Aude Bourniquel, Guillaume Witz, Beth Weiner, Mara Prentiss, et Nancy Kleckner. 2013. « Four-dimensional imaging of E. coli nucleoid organization and dynamics in living cells ». *Cell* 153 (4): 882-95.

Gandhi, Rita, Peter J. Gillespie, et Tatsuya Hirano. 2006. « Human Wapl is a cohesin-binding protein that promotes sister-chromatid resolution in mitotic prophase ». *Current Biology* 16 (24): 2406-17.

Ganji, Mahipal, Indra A. Shaltiel, Shveta Bisht, Eugene Kim, Ana Kalichava, Christian H. Haering, et Cees Dekker. 2018. « Real-time imaging of DNA loop extrusion by condensin ». *Science* 360 (6384): 102-5.

Gerlich, Daniel, Birgit Koch, Florine Dupeux, Jan-Michael Peters, et Jan Ellenberg. 2006. « Live-cell imaging reveals a stable cohesin-chromatin interaction after but not before DNA replication ». *Current Biology* 16 (15): 1571-78.

Gibcus, Johan H., Kumiko Samejima, Anton Goloborodko, Itaru Samejima, Natalia Naumova, Johannes Nuebler, Masato T. Kanemaki, Linfeng Xie, James R. Paulson, et William C.

Earnshaw. 2018. « A pathway for mitotic chromosome formation ». *Science* 359 (6376): eaao6135.

Giet, Régis, et David M. Glover. 2001. « Drosophila aurora B kinase is required for histone H3 phosphorylation and condensin recruitment during chromosome condensation and to organize the central spindle during cytokinesis ». *The Journal of cell biology* 152 (4): 669-82.

Gruber, Stephan, et Jeff Errington. 2009. « Recruitment of condensin to replication origin regions by ParB/SpoOJ promotes chromosome segregation in B. subtilis ». *Cell* 137 (4): 685-96.

Guacci, Vincent, Eileen Hogan, et Douglas Koshland. 1994. « Chromosome condensation and sister chromatid pairing in budding yeast. » *The Journal of cell biology* 125 (3): 517-30.

Guelen, Lars, Ludo Pagie, Emilie Brasset, Wouter Meuleman, Marius B. Faza, Wendy Talhout, Bert H. Eussen, Annelies De Klein, Lodewyk Wessels, et Wouter De Laat. 2008. « Domain organization of human chromosomes revealed by mapping of nuclear lamina interactions ». *Nature* 453 (7197): 948-51.

Hadjur, Suzana, Luke M. Williams, Natalie K. Ryan, Bradley S. Cobb, Tom Sexton, Peter Fraser, Amanda G. Fisher, et Matthias Merkenschlager. 2009. « Cohesins form chromosomal cis-interactions at the developmentally regulated IFNG locus ». *Nature* 460 (7253): 410-13.

Haering, Christian H., Jan Löwe, Andreas Hochwagen, et Kim Nasmyth. 2002. « Molecular architecture of SMC proteins and the yeast cohesin complex ». *Molecular cell* 9 (4): 773-88.

Hagstrom, Kirsten A., Victor F. Holmes, Nicholas R. Cozzarelli, et Barbara J. Meyer. 2002. « C. elegans condensin promotes mitotic chromosome architecture, centromere organization, and sister chromatid segregation during mitosis and meiosis ». *Genes & development* 16 (6): 729-42.

Handoko, Lusy, Han Xu, Guoliang Li, Chew Yee Ngan, Elaine Chew, Marie Schnapp, Charlie Wah Heng Lee, Chaopeng Ye, Joanne Lim Hui Ping, et Fabianus Mulawadi. 2011. « CTCF-mediated functional chromatin interactome in pluripotent cells ». *Nature genetics* 43 (7): 630-38.

Hartl, Tom A., Helen F. Smith, et Giovanni Bosco. 2008. « Chromosome alignment and transvection are antagonized by condensin II ». *Science* 322 (5906): 1384-87.

Heger, Peter, Birger Marin, Marek Bartkuhn, Einhard Schierenberg, et Thomas Wiehe. 2012. « The chromatin insulator CTCF and the emergence of metazoan diversity ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109 (43): 17507-12.

Heidinger-Pauli, Jill M., Ozlem Mert, Carol Davenport, Vincent Guacci, et Douglas Koshland. 2010. « Systematic reduction of cohesin differentially affects chromosome segregation, condensation, and DNA repair ». *Current biology* 20 (10): 957-63.

Hirano, Tatsuya, et Timothy J. Mitchison. 1994. « A heterodimeric coiled-coil protein required for mitotic chromosome condensation in vitro ». *Cell* 79 (3): 449-58.

Hofmann, Andreas, Jarno Mäkelä, David J. Sherratt, Dieter Heermann, et Seán M. Murray. 2019. « Self-organised segregation of bacterial chromosomal origins ». *Elife* 8: e46564.

Houlard, Martin, Erin E. Cutts, Muhammad S. Shamim, Jonathan Godwin, David Weisz, Aviva Presser Aiden, Erez Lieberman Aiden, Lothar Schermelleh, Alessandro Vannini, et Kim Nasmyth. 2021. « MCPH1 inhibits condensin II during interphase by regulating its SMC2-kleisin interface ». *Elife* 10: e73348.

Ishiguro, Kei-ichiro. 2019. « The cohesin complex in mammalian meiosis ». *Genes to Cells* 24 (1): 6-30.

Ishiguro, Kei-ichiro, Jihye Kim, Sally Fujiyama-Nakamura, Shigeaki Kato, et Yoshinori Watanabe. 2011. « A new meiosis-specific cohesin complex implicated in the cohesin code for homologous pairing ». *EMBO reports* 12 (3): 267-75.

Iwasaki, Osamu, Hideki Tanizawa, Kyoung-Dong Kim, Yuhki Yokoyama, Christopher J. Corcoran, Atsunari Tanaka, Emmanuel Skordalakes, Louise C. Showe, et Ken-ichi Noma. 2015. « Interaction between TBP and condensin drives the organization and faithful segregation of mitotic chromosomes ». *Molecular cell* 59 (5): 755-67.

Jalal, Adam SB, et Tung BK Le. 2020. « Bacterial chromosome segregation by the ParABS system ». *Open biology* 10 (6): 200097.

Japaridze, Aleksandre, Raman van Wee, Christos Gogou, Jacob WJ Kerssemakers, et Cees Dekker. 2022. « MukBEF-dependent chromosomal organization in widened Escherichia coli ». *bioRxiv*, 2022.07. 13.499882.

Joshi, Mohan C., David Magnan, Timothy P. Montminy, Mark Lies, Nicholas Stepankiw, et David Bates. 2013. « Regulation of sister chromosome cohesion by the replication fork tracking protein SeqA ». *PLoS genetics* 9 (8): e1003673.

Kagey, Michael H., Jamie J. Newman, Steve Bilodeau, Ye Zhan, David A. Orlando, Nynke L. van Berkum, Christopher C. Ebmeier, Jesse Goossens, Peter B. Rahl, et Stuart S. Levine. 2010. « Mediator and cohesin connect gene expression and chromatin architecture ». *Nature* 467 (7314): 430-35.

Karaboja, Xheni, Zhongqing Ren, Hugo B. Brandão, Payel Paul, David Z. Rudner, et Xindan Wang. 2021. « XerD Unloads Bacterial SMC Complexes at the Replication Terminus ». *Molecular Cell* 81 (4): 756-766.e8. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2020.12.027.

Kawalek, Adam, Pawel Wawrzyniak, Aneta Agnieszka Bartosik, et Grazyna Jagura-Burdzy. 2020. « Rules and exceptions: the role of chromosomal ParB in DNA segregation and other cellular processes ». *Microorganisms* 8 (1).

Kellenberger, Edouard, Antoinette Ryter, et Janine Séchaud. 1958. « Electron microscope study of DNA-containing plasms: II. Vegetative and mature phage DNA as compared with normal bacterial nucleoids in different physiological states ». *The Journal of Cell Biology* 4 (6): 671-78.

Kim, Yoori, Zhubing Shi, Hongshan Zhang, Ilya J. Finkelstein, et Hongtao Yu. 2019. « Human cohesin compacts DNA by loop extrusion ». *Science* 366 (6471): 1345-49.

Kimura, Keiji, et Tatsuya Hirano. 1997. « ATP-dependent positive supercoiling of DNA by 13S condensin: a biochemical implication for chromosome condensation ». *Cell* 90 (4): 625-34.

Kojic, Aleksandar, Ana Cuadrado, Magali De Koninck, Daniel Giménez-Llorente, Miriam Rodríguez-Corsino, Gonzalo Gómez-López, François Le Dily, Marc A. Marti-Renom, et Ana Losada. 2018. « Distinct roles of cohesin-SA1 and cohesin-SA2 in 3D chromosome organization ». *Nature structural & molecular biology* 25 (6): 496-504.

Kong, Muwen, Erin E. Cutts, Dongqing Pan, Fabienne Beuron, Thangavelu Kaliyappan, Chaoyou Xue, Edward P. Morris, Andrea Musacchio, Alessandro Vannini, et Eric C. Greene. 2020. « Human condensin I and II drive extensive ATP-dependent compaction of nucleosome-bound DNA ». *Molecular cell* 79 (1): 99-114. e9.

Kueng, Stephanie, Björn Hegemann, Beate H. Peters, Jesse J. Lipp, Alexander Schleiffer, Karl Mechtler, et Jan-Michael Peters. 2006. « Wapl controls the dynamic association of cohesin with chromatin ». *Cell* 127 (5): 955-67.

Le, Tung BK, Maxim V. Imakaev, Leonid A. Mirny, et Michael T. Laub. 2013. « High-resolution mapping of the spatial organization of a bacterial chromosome ». *Science* 342 (6159): 731-34.

Le, Tung BK, et Michael T. Laub. 2016. « Transcription rate and transcript length drive formation of chromosomal interaction domain boundaries ». *The EMBO journal* 35 (14): 1582-95.

Lee, Byung-Gil, Fabian Merkel, Matteo Allegretti, Markus Hassler, Christopher Cawood, Lea Lecomte, Francis J. O'Reilly, Ludwig R. Sinn, Pilar Gutierrez-Escribano, et Marc Kschonsak. 2020. « Cryo-EM structures of holo condensin reveal a subunit flip-flop mechanism ». *Nature structural & molecular biology* 27 (8): 743-51.

Lee, Jibak, et Tatsuya Hirano. 2011. « RAD21L, a novel cohesin subunit implicated in linking homologous chromosomes in mammalian meiosis ». *Journal of Cell Biology* 192 (2): 263-76.

Lesterlin, Christian, Emmanuelle Gigant, Frédéric Boccard, et Olivier Espéli. 2012. « Sister Chromatid Interactions in Bacteria Revealed by a Site-Specific Recombination Assay: Sister Chromatid Cohesion in *E. Coli* ». *The EMBO Journal* 31 (16): 3468-79. https://doi.org/10.1038/emboj.2012.194.

Li, Yan, Judith HI Haarhuis, Ángela Sedeño Cacciatore, Roel Oldenkamp, Marjon S. van Ruiten, Laureen Willems, Hans Teunissen, Kyle W. Muir, Elzo de Wit, et Benjamin D. Rowland. 2020. « The structural basis for cohesin–CTCF-anchored loops ». *Nature* 578 (7795): 472-76.

Lieberman-Aiden, Erez, Nynke L. Van Berkum, Louise Williams, Maxim Imakaev, Tobias Ragoczy, Agnes Telling, Ido Amit, Bryan R. Lajoie, Peter J. Sabo, et Michael O. Dorschner. 2009. « Comprehensive mapping of long-range interactions reveals folding principles of the human genome ». *science* 326 (5950): 289-93.

Lioy, Virginia S., Axel Cournac, Martial Marbouty, Stéphane Duigou, Julien Mozziconacci, Olivier Espéli, Frédéric Boccard, et Romain Koszul. 2018. « Multiscale structuring of the E. coli chromosome by nucleoid-associated and condensin proteins ». *Cell* 172 (4): 771-783. e18.

Lioy, Virginia S., Ivan Junier, et Frédéric Boccard. 2021. « Multiscale dynamic structuring of bacterial chromosomes ». *Annual review of microbiology* 75: 541-61.

Lioy, Virginia S., Ivan Junier, Valentine Lagage, Isabelle Vallet, et Frédéric Boccard. 2020. « Distinct activities of bacterial condensins for chromosome management in Pseudomonas aeruginosa ». *Cell reports* 33 (5): 108344.

Lioy, Virginia S., Jean-Noel Lorenzi, Soumaya Najah, Thibault Poinsignon, Herve Leh, Corinne Saulnier, Bertrand Aigle, Sylvie Lautru, Annabelle Thibessard, et Olivier Lespinet. 2021. « Dynamics of the compartmentalized Streptomyces chromosome during metabolic differentiation ». *Nature communications* 12 (1): 1-14.

Lipp, Jesse J., Toru Hirota, Ina Poser, et Jan-Michael Peters. 2007. « Aurora B controls the association of condensin I but not condensin II with mitotic chromosomes ». *Journal of cell science* 120 (7): 1245-55.

Liu, Gui-Rong, Wei-Qiao Liu, Randal N. Johnston, Kenneth E. Sanderson, Shao-Xian Li, et Shu-Lin Liu. 2006. « Genome plasticity and ori-ter rebalancing in Salmonella typhi ». *Molecular Biology and Evolution* 23 (2): 365-71.

Livny, Jonathan, Yoshiharu Yamaichi, et Matthew K. Waldor. 2007. « Distribution of centromere-like parS sites in bacteria: insights from comparative genomics ». *Journal of bacteriology* 189 (23): 8693-8703.

Losada, Ana. 2014. « Cohesin in cancer: chromosome segregation and beyond ». *Nature Reviews Cancer* 14 (6): 389-93.

Losada, Ana, Tomoki Yokochi, Ryuji Kobayashi, et Tatsuya Hirano. 2000. « Identification and characterization of SA/Scc3p subunits in the Xenopus and human cohesin complexes ». *The Journal of cell biology* 150 (3): 405-16.

Mäkelä, Jarno, et David J. Sherratt. 2020. « Organization of the Escherichia coli chromosome by a MukBEF axial core ». *Molecular Cell* 78 (2): 250-260. e5.

Makrantoni, Vasso, et Adele L. Marston. 2018. « Cohesin and chromosome segregation ». *Current Biology* 28 (12): R688-93.

Marbouty, Martial, Antoine Le Gall, Diego I. Cattoni, Axel Cournac, Alan Koh, Jean-Bernard Fiche, Julien Mozziconacci, Heath Murray, Romain Koszul, et Marcelo Nollmann. 2015. « Condensin-and replication-mediated bacterial chromosome folding and origin condensation revealed by Hi-C and super-resolution imaging ». *Molecular cell* 59 (4): 588-602.

McDonel, Patrick, Judith Jans, Brant K. Peterson, et Barbara J. Meyer. 2006. « Clustered DNA motifs mark X chromosomes for repression by a dosage compensation complex ». *Nature* 444 (7119): 614-18.

Melby, Thomas E., Charles N. Ciampaglio, Gina Briscoe, et Harold P. Erickson. 1998. « The symmetrical structure of structural maintenance of chromosomes (SMC) and MukB proteins: long, antiparallel coiled coils, folded at a flexible hinge ». *The Journal of cell biology* 142 (6): 1595-1604.

Mercier, Romain, Marie-Agnès Petit, Sophie Schbath, Stephane Robin, Meriem El Karoui, Frédéric Boccard, et Olivier Espéli. 2008. « The MatP/matS site-specific system organizes the terminus region of the E. coli chromosome into a macrodomain ». *Cell* 135 (3): 475-85.

Minnen, Anita, Laetitia Attaiech, Maria Thon, Stephan Gruber, et Jan-Willem Veening. 2011. « SMC is recruited to oriC by ParB and promotes chromosome segregation in Streptococcus pneumoniae ». *Molecular microbiology* 81 (3): 676-88.

Minnen, Anita, Frank Bürmann, Larissa Wilhelm, Anna Anchimiuk, Marie-Laure Diebold-Durand, et Stephan Gruber. 2016. « Control of Smc coiled coil architecture by the ATPase heads facilitates targeting to chromosomal ParB/parS and release onto flanking DNA ». *Cell reports* 14 (8): 2003-16.

Mishiro, Tsuyoshi, Ko Ishihara, Shinjiro Hino, Shuichi Tsutsumi, Hiroyuki Aburatani, Katsuhiko Shirahige, Yoshikazu Kinoshita, et Mitsuyoshi Nakao. 2009. « Architectural roles of multiple chromatin insulators at the human apolipoprotein gene cluster ». *The EMBO journal* 28 (9): 1234-45.

Morishita, Jun, Takahiro Matsusaka, Gohta Goshima, Takahiro Nakamura, Hisashi Tatebe, et Mitsuhiro Yanagida. 2001. « Bir1/Cut17 moving from chromosome to spindle upon the loss of cohesion is required for condensation, spindle elongation and repair ». *Genes to Cells* 6 (9): 743-63.

Murray, Seán M., et Victor Sourjik. 2017. « Self-organization and positioning of bacterial protein clusters ». *Nature Physics* 13 (10): 1006-13.

Narendra, Varun, Pedro P. Rocha, Disi An, Ramya Raviram, Jane A. Skok, Esteban O. Mazzoni, et Danny Reinberg. 2015. « CTCF establishes discrete functional chromatin domains at the Hox clusters during differentiation ». *Science* 347 (6225): 1017-21.

Nativio, Raffaella, Kerstin S. Wendt, Yoko Ito, Joanna E. Huddleston, Santiago Uribe-Lewis, Kathryn Woodfine, Christel Krueger, Wolf Reik, Jan-Michael Peters, et Adele Murrell. 2009. « Cohesin is required for higher-order chromatin conformation at the imprinted IGF2-H19 locus ». *PLoS genetics* 5 (11): e1000739.

Nicolas, Emilien, Amy L. Upton, Stephan Uphoff, Olivia Henry, Anjana Badrinarayanan, et David Sherratt. 2014. « The SMC Complex MukBEF Recruits Topoisomerase IV to the Origin of Replication Region in Live Escherichia Coli ». *MBio* 5 (1): e01001-13. https://doi.org/10.1128/mBio.01001-13.

Nielsen, Henrik J., Jesper R. Ottesen, Brenda Youngren, Stuart J. Austin, et Flemming G. Hansen. 2006. « The Escherichia coli chromosome is organized with the left and right chromosome arms in separate cell halves ». *Molecular microbiology* 62 (2): 331-38.

Niki, Hironori, Ryu Imamura, M. Kitaoka, K. Yamanaka, T. Ogura, et S. Hiraga. 1992. « E. coli MukB protein involved in chromosome partition forms a homodimer with a rod-and-hinge structure having DNA binding and ATP/GTP binding activities. » *The EMBO journal* 11 (13): 5101-9.

Niki, Hironori, Aline Jaffe, Ryu Imamura, Teru Ogura, et Sota Hiraga. 1991. « The new gene mukB codes for a 177 kd protein with coiled-coil domains involved in chromosome partitioning of E. coli. » *The EMBO journal* 10 (1): 183-93.

Niki, Hironori, et Koichi Yano. 2016. « In vitro topological loading of bacterial condensin MukB on DNA, preferentially single-stranded DNA rather than double-stranded DNA ». *Scientific reports* 6 (1): 1-11.

Nishana, Mayilaadumveettil, Caryn Ha, Javier Rodriguez-Hernaez, Ali Ranjbaran, Erica Chio, Elphege P. Nora, Sana B. Badri, Andreas Kloetgen, Benoit G. Bruneau, et Aristotelis Tsirigos. 2020. « Defining the relative and combined contribution of CTCF and CTCFL to genomic regulation ». *Genome biology* 21 (1): 1-34.

Nishiyama, Tomoko, Rene Ladurner, Julia Schmitz, Emanuel Kreidl, Alexander Schleiffer, Venugopal Bhaskara, Masashige Bando, Katsuhiko Shirahige, Anthony A. Hyman, et Karl Mechtler. 2010. « Sororin mediates sister chromatid cohesion by antagonizing Wapl ». *Cell* 143 (5): 737-49.

Nolivos, Sophie, Amy L. Upton, Anjana Badrinarayanan, Julius Müller, Katarzyna Zawadzka, Jakub Wiktor, Amber Gill, Lidia Arciszewska, Emilien Nicolas, et David Sherratt. 2016. « MatP Regulates the Coordinated Action of Topoisomerase IV and MukBEF in Chromosome Segregation ». *Nature Communications* 7 (janvier): 10466. https://doi.org/10.1038/ncomms10466.

Nomidis, Stefanos K., Enrico Carlon, Stephan Gruber, et John F. Marko. 2022. « DNA tension-modulated translocation and loop extrusion by SMC complexes revealed by molecular dynamics simulations ». *Nucleic Acids Research* 50 (9): 4974-87.

Noordermeer, Daan, et Wouter de Laat. 2008. « Joining the loops: β-Globin gene regulation ». *IUBMB life* 60 (12): 824-33.

Nora, Elphège P., Laura Caccianini, Geoffrey Fudenberg, Kevin So, Vasumathi Kameswaran, Abigail Nagle, Alec Uebersohn, Bassam Hajj, Agnès Le Saux, et Antoine Coulon. 2020. « Molecular basis of CTCF binding polarity in genome folding ». *Nature communications* 11 (1): 1-13.

Nunez, Roberto Vazquez, Laura B. Ruiz Avila, et Stephan Gruber. 2019. « Transient DNA occupancy of the SMC interarm space in prokaryotic condensin ». *Molecular cell* 75 (2): 209-223. e6.

Nunez, Roberto Vazquez, Yevhen Polyhach, Young-Min Soh, Gunnar Jeschke, et Stephan Gruber. 2021. « Gradual opening of Smc arms in prokaryotic condensin ». *Cell Reports* 35 (4): 109051.

Ong, Chin-Tong, et Victor G. Corces. 2014. « CTCF: an architectural protein bridging genome topology and function ». *Nature Reviews Genetics* 15 (4): 234-46.

Ono, Takao, Ana Losada, Michiko Hirano, Michael P. Myers, Andrew F. Neuwald, et Tatsuya Hirano. 2003. « Differential contributions of condensin I and condensin II to mitotic chromosome architecture in vertebrate cells ». *Cell* 115 (1): 109-21.

Osorio-Valeriano, Manuel, Florian Altegoer, Chandan K. Das, Wieland Steinchen, Gaël Panis, Lara Connolley, Giacomo Giacomelli, Helge Feddersen, Laura Corrales-Guerrero, et Pietro I. Giammarinaro. 2021. « The CTPase activity of ParB determines the size and

dynamics of prokaryotic DNA partition complexes ». *Molecular cell* 81 (19): 3992-4007. e10.

Petrushenko, Zoya M., Weifeng She, et Valentin V. Rybenkov. 2011. « A new family of bacterial condensins ». *Molecular microbiology* 81 (4): 881-96.

Phillips, Jennifer E., et Victor G. Corces. 2009. « CTCF: master weaver of the genome ». *Cell* 137 (7): 1194-1211.

Postow, Lisa, Christine D. Hardy, Javier Arsuaga, et Nicholas R. Cozzarelli. 2004. « Topological domain structure of the Escherichia coli chromosome ». *Genes & development* 18 (14): 1766-79.

Pradhan, Biswajit, Roman Barth, Eugene Kim, Iain F. Davidson, Benedikt Bauer, Theo van Laar, Wayne Yang, Je-Kyung Ryu, Jaco van der Torre, et Jan-Michael Peters. 2022. « SMC complexes can traverse physical roadblocks bigger than their ring size ». *Cell Reports* 41 (3): 111491.

Prince, Josh P., Jani R. Bolla, Gemma LM Fisher, Jarno Mäkelä, Marjorie Fournier, Carol V. Robinson, Lidia K. Arciszewska, et David J. Sherratt. 2021. « Acyl carrier protein promotes MukBEF action in Escherichia coli chromosome organization-segregation ». *Nature communications* 12 (1): 1-12.

Ptacin, Jerod L., Steven F. Lee, Ethan C. Garner, Esteban Toro, Michael Eckart, Luis R. Comolli, W. E. Moerner, et Lucy Shapiro. 2010. « A spindle-like apparatus guides bacterial chromosome segregation ». *Nature cell biology* 12 (8): 791-98.

Pugacheva, Elena M., Naoki Kubo, Dmitri Loukinov, Md Tajmul, Sungyun Kang, Alexander L. Kovalchuk, Alexander V. Strunnikov, Gabriel E. Zentner, Bing Ren, et Victor V. Lobanenkov. 2020. « CTCF mediates chromatin looping via N-terminal domain-dependent cohesin retention ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 117 (4): 2020-31.

Rajasekar, Karthik V., Rachel Baker, Gemma L. M. Fisher, Jani R. Bolla, Jarno Mäkelä, Minzhe Tang, Katarzyna Zawadzka, Oliwia Koczy, Florence Wagner, et Carol V. Robinson. 2019. « Dynamic architecture of the Escherichia coli structural maintenance of chromosomes (SMC) complex, MukBEF ». *Nucleic acids research* 47 (18): 9696-9707.

Rao, Suhas SP, Miriam H. Huntley, Neva C. Durand, Elena K. Stamenova, Ivan D. Bochkov, James T. Robinson, Adrian L. Sanborn, Ido Machol, Arina D. Omer, et Eric S. Lander. 2014. « A 3D map of the human genome at kilobase resolution reveals principles of chromatin looping ». *Cell* 159 (7): 1665-80.

Ren, Zhongqing, Qin Liao, Xheni Karaboja, Ian S. Barton, Eli G. Schantz, Adrian Mejia-Santana, Clay Fuqua, et Xindan Wang. 2022. « Conformation and dynamic interactions of the multipartite genome in Agrobacterium tumefaciens ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 119 (6): e2115854119.

Revenkova, Ekaterina, Maureen Eijpe, Christa Heyting, Craig A. Hodges, Patricia A. Hunt, Bodo Liebe, Harry Scherthan, et Rolf Jessberger. 2004. « Cohesin SMC1β is required for meiotic chromosome dynamics, sister chromatid cohesion and DNA recombination ». *Nature cell biology* 6 (6): 555-62.

Rocha, Eduardo PC. 2008. « The organization of the bacterial genome ». *Annual review of genetics* 42: 211-33.

Rowley, M. Jordan, et Victor G. Corces. 2018. « Organizational principles of 3D genome architecture ». *Nature Reviews Genetics* 19 (12): 789-800.

Saka, Yasushi, Takashi Sutani, Yukiko Yamashita, Shigeaki Saitoh, Masahiro Takeuchi, Yukinobu Nakaseko, et Mitsuhiro Yanagida. 1994. « Fission yeast cut3 and cut14, members of a ubiquitous protein family, are required for chromosome condensation and segregation in mitosis. » *The EMBO journal* 13 (20): 4938-52.

Sawitzke, James A., et Stuart Austin. 2000. « Suppression of chromosome segregation defects of Escherichia coli muk mutants by mutations in topoisomerase I ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97 (4): 1671-76.

Schaaf, Cheri A., Ziva Misulovin, Gurmukh Sahota, Akbar M. Siddiqui, Yuri B. Schwartz, Tatyana G. Kahn, Vincenzo Pirrotta, Maria Gause, et Dale Dorsett. 2009. « Regulation of the Drosophila Enhancer of split and invected-engrailed gene complexes by sister chromatid cohesion proteins ». *PloS one* 4 (7): e6202.

Shaltiel, Indra A., Sumanjit Datta, Léa Lecomte, Markus Hassler, Marc Kschonsak, Sol Bravo, Catherine Stober, Jenny Ormanns, Sebastian Eustermann, et Christian H. Haering. 2022. « A hold-and-feed mechanism drives directional DNA loop extrusion by condensin ». *Science* 376 (6597): 1087-94.

Skoko, Dunja, Daniel Yoo, Hua Bai, Bernhard Schnurr, Jie Yan, Sarah M. McLeod, John F. Marko, et Reid C. Johnson. 2006. « Mechanism of chromosome compaction and looping by the Escherichia coli nucleoid protein Fis ». *Journal of molecular biology* 364 (4): 777-98.

Soppa, Jorg, Kazuo Kobayashi, Marie-Francoise Noirot-Gros, Dieter Oesterhelt, S. Dusko Ehrlich, Etienne Dervyn, Naotake Ogasawara, et Shigeki Moriya. 2002. « Discovery of Two Novel Families of Proteins That Are Proposed to Interact with Prokaryotic SMC Proteins, and Characterization of the Bacillus Subtilis Family Members ScpA and ScpB ». *Molecular Microbiology* 45 (1): 59-71. https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2002.03012.x.

Stouf, Mathieu, Jean-Christophe Meile, et François Cornet. 2013. « FtsK Actively Segregates Sister Chromosomes in *Escherichia Coli* ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110 (27): 11157-62. https://doi.org/10.1073/pnas.1304080110.

St-Pierre, Julie, Mélanie Douziech, Franck Bazile, Mirela Pascariu, Eric Bonneil, Véronique Sauvé, Hery Ratsima, et Damien D'Amours. 2009. « Polo kinase regulates mitotic chromosome condensation by hyperactivation of condensin DNA supercoiling activity ». *Molecular cell* 34 (4): 416-26.

Stracy, Mathew, Jakob Schweizer, David J. Sherratt, Achillefs N. Kapanidis, Stephan Uphoff, et Christian Lesterlin. 2021. « Transient non-specific DNA binding dominates the target search of bacterial DNA-binding proteins ». *Molecular cell* 81 (7): 1499-1514. e6.

Strunnikov, Alexander V., Vladimir L. Larionov, et Douglas Koshland. 1993. « SMC1: an essential yeast gene encoding a putative head-rod-tail protein is required for nuclear division and defines a new ubiquitous protein family. » *The Journal of cell biology* 123 (6): 1635-48.

Sullivan, Nora L., Kathleen A. Marquis, et David Z. Rudner. 2009. « Recruitment of SMC by ParB-parS organizes the origin region and promotes efficient chromosome segregation ». *Cell* 137 (4): 697-707.

Sumara, Izabela, Elisabeth Vorlaufer, Christian Gieffers, Beate H. Peters, et Jan-Michael Peters. 2000. « Characterization of vertebrate cohesin complexes and their regulation in prophase ». *The Journal of cell biology* 151 (4): 749-62.

Takemoto, Ai, Keiji Kimura, Junn Yanagisawa, Shigeyuki Yokoyama, et Fumio Hanaoka. 2006. « Negative regulation of condensin I by CK2-mediated phosphorylation ». *The EMBO Journal* 25 (22): 5339-48. https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601394.

Takemoto, Ai, Keiji Kimura, Shigeyuki Yokoyama, et Fumio Hanaoka. 2004. « Cell cycle-dependent phosphorylation, nuclear localization, and activation of human condensin ». *Journal of Biological Chemistry* 279 (6): 4551-59.

Thattikota, Yogitha, Sylvain Tollis, Roger Palou, Justine Vinet, Mike Tyers, et Damien D'Amours. 2018. « Cdc48/VCP promotes chromosome morphogenesis by releasing condensin from self-entrapment in chromatin ». *Molecular cell* 69 (4): 664-676. e5.

Thiel, Axel, Michèle Valens, Isabelle Vallet-Gely, Olivier Espéli, et Frédéric Boccard. 2012. « Long-range chromosome organization in E. coli: a site-specific system isolates the Ter macrodomain ». *PLoS genetics* 8 (4): e1002672.

Tišma, Miloš, Maria Panoukidou, Hammam Antar, Young-Min Soh, Roman Barth, Biswajit Pradhan, Anders Barth, Jaco van der Torre, Davide Michieletto, et Stephan Gruber. 2022. « ParB proteins can bypass DNA-bound roadblocks via dimer-dimer recruitment ». *Science Advances* 8 (26): eabn3299.

Tran, Ngat T., Michael T. Laub, et Tung BK Le. 2017. « SMC progressively aligns chromosomal arms in Caulobacter crescentus but is antagonized by convergent transcription ». *Cell reports* 20 (9): 2057-71.

Uhlmann, Frank. 2016. « SMC complexes: from DNA to chromosomes ». *Nature reviews Molecular cell biology* 17 (7): 399-412.

Uhlmann, Frank, Dominik Wernic, Marc-André Poupart, Eugene V. Koonin, et Kim Nasmyth. 2000. « Cleavage of cohesin by the CD clan protease separin triggers anaphase in yeast ». *Cell* 103 (3): 375-86.

Valens, Michèle, Stéphanie Penaud, Michèle Rossignol, François Cornet, et Frédéric Boccard. 2004. « Macrodomain organization of the Escherichia coli chromosome ». *The EMBO journal* 23 (21): 4330-41.

Valens, Michèle, Axel Thiel, et Frédéric Boccard. 2016. « The MaoP/maoS site-specific system organizes the Ori region of the E. coli chromosome into a macrodomain ». *PLoS genetics* 12 (9): e1006309.

Vallet-Gely, Isabelle, et Frédéric Boccard. 2013. « Chromosomal organization and segregation in Pseudomonas aeruginosa ». *PLoS genetics* 9 (5): e1003492.

Vecchiarelli, Anthony G., Kiyoshi Mizuuchi, et Barbara E. Funnell. 2012. « Surfing biological surfaces: exploiting the nucleoid for partition and transport in bacteria ». *Molecular microbiology* 86 (3): 513-23.

Viollier, Patrick H., Martin Thanbichler, Patrick T. McGrath, Lisandra West, Maliwan Meewan, Harley H. McAdams, et Lucy Shapiro. 2004. « Rapid and sequential movement of individual chromosomal loci to specific subcellular locations during bacterial DNA replication ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101 (25): 9257-62.

Waizenegger, Irene C., Silke Hauf, Andreas Meinke, et Jan-Michael Peters. 2000. « Two distinct pathways remove mammalian cohesin from chromosome arms in prophase and from centromeres in anaphase ». *Cell* 103 (3): 399-410.

Walther, Nike, M. Julius Hossain, Antonio Z. Politi, Birgit Koch, Moritz Kueblbeck, Øyvind Ødegård-Fougner, Marko Lampe, et Jan Ellenberg. 2018. « A quantitative map of human Condensins provides new insights into mitotic chromosome architecture ». *Journal of Cell Biology* 217 (7): 2309-28.

Wang, Xindan, Hugo B. Brandão, Tung BK Le, Michael T. Laub, et David Z. Rudner. 2017. « Bacillus subtilis SMC complexes juxtapose chromosome arms as they travel from origin to terminus ». *Science* 355 (6324): 524-27.

Wang, Xindan, Anna C. Hughes, Hugo B. Brandão, Benjamin Walker, Carrie Lierz, Jared C. Cochran, Martha G. Oakley, Andrew C. Kruse, et David Z. Rudner. 2018. « In vivo evidence for ATPase-dependent DNA translocation by the Bacillus subtilis SMC condensin complex ». *Molecular cell* 71 (5): 841-847. e5.

Wang, Xindan, Tung BK Le, Bryan R. Lajoie, Job Dekker, Michael T. Laub, et David Z. Rudner. 2015. « Condensin promotes the juxtaposition of DNA flanking its loading site in Bacillus subtilis ». *Genes & development* 29 (15): 1661-75.

Wang, Xindan, Xun Liu, Christophe Possoz, et David J. Sherratt. 2006. « The two Escherichia coli chromosome arms locate to separate cell halves ». *Genes & development* 20 (13): 1727-31.

Wang, Xindan, Olive W. Tang, Eammon P. Riley, et David Z. Rudner. 2014. « The SMC condensin complex is required for origin segregation in Bacillus subtilis ». *Current Biology* 24 (3): 287-92.

Watrin, Erwan, Fabien Cubizolles, H. Beverley Osborne, Katherine Le Guellec, et Vincent Legagneux. 2003. « Expression and functional dynamics of the XCAP-D2 condensin subunit in Xenopus laevis oocytes ». *Journal of Biological Chemistry* 278 (28): 25708-15.

Weitao, Tao, Kurt Nordström, et Santanu Dasgupta. 1999. « Mutual suppression of mukB and seqA phenotypes might arise from their opposing influences on the Escherichia coli nucleoid structure ». *Molecular microbiology* 34 (1): 157-68.

Wendt, Kerstin S., Keisuke Yoshida, Takehiko Itoh, Masashige Bando, Birgit Koch, Erika Schirghuber, Shuichi Tsutsumi, Genta Nagae, Ko Ishihara, et Tsuyoshi Mishiro. 2008. « Cohesin mediates transcriptional insulation by CCCTC-binding factor ». *Nature* 451 (7180): 796-801.

Winters, Tristan, Francois McNicoll, et Rolf Jessberger. 2014. « Meiotic cohesin STAG 3 is required for chromosome axis formation and sister chromatid cohesion ». *The EMBO journal* 33 (11): 1256-70.

Wit, Elzo de, Erica SM Vos, Sjoerd JB Holwerda, Christian Valdes-Quezada, Marjon JAM Verstegen, Hans Teunissen, Erik Splinter, Patrick J. Wijchers, Peter HL Krijger, et Wouter de Laat. 2015. « CTCF binding polarity determines chromatin looping ». *Molecular cell* 60 (4): 676-84.

Woo, Jae-Sung, Jae-Hong Lim, Ho-Chul Shin, Min-Kang Suh, Bonsu Ku, Kwang-Hoon Lee, Keehyoung Joo, Howard Robinson, Jooyoung Lee, et Sam-Yong Park. 2009. « Structural studies of a bacterial condensin complex reveal ATP-dependent disruption of intersubunit interactions ». *Cell* 136 (1): 85-96.

Worcel, Abraham, et Elizabeth Burgi. 1972. « On the structure of the folded chromosome of Escherichia coli ». *Journal of molecular biology* 71 (2): 127-47.

Wu, Fabai, Aleksandre Japaridze, Xuan Zheng, Jakub Wiktor, Jacob WJ Kerssemakers, et Cees Dekker. 2019. « Direct imaging of the circular chromosome in a live bacterium ». *Nature communications* 10 (1): 1-9.

Wu, Fabai, Pinaki Swain, Louis Kuijpers, Xuan Zheng, Kevin Felter, Margot Guurink, Jacopo Solari, Suckjoon Jun, Thomas S. Shimizu, et Debasish Chaudhuri. 2019. « Cell boundary confinement sets the size and position of the E. coli chromosome ». *Current Biology* 29 (13): 2131-2144. e4.

Wu, Ling Juan, et Jeff Errington. 2003. « RacA and the Soj-Spo0J system combine to effect polar chromosome segregation in sporulating Bacillus subtilis ». *Molecular microbiology* 49 (6): 1463-75.

Wutz, Gordana, Csilla Várnai, Kota Nagasaka, David A. Cisneros, Roman R. Stocsits, Wen Tang, Stefan Schoenfelder, Gregor Jessberger, Matthias Muhar, et M. Julius Hossain. 2017. « Topologically associating domains and chromatin loops depend on cohesin and are regulated by CTCF, WAPL, and PDS5 proteins ». *The EMBO journal* 36 (24): 3573-99.

Yamanaka, Kunitoshi, Tadao Mitani, Jin Feng, Teru Ogura, Hironori Niki, et Sota Hiraga. 1994. « Two mutant alleles of mukB, a gene essential for chromosome partition in Escherichia coli ». *FEMS microbiology letters* 123 (1-2): 27-31.

Yamanaka, Kunitoshi, Teru Ogura, Hironori Niki, et Sota Hiraga. 1996. « Identification of two new genes, mukE andmukF, involved in chromosome partitioning inEscherichia coli ». *Molecular and General Genetics MGG* 250 (3): 241-51.

Yamazoe, Mitsuyoshi, Toshinari Onogi, Yumi Sunako, Hironori Niki, Kunitoshi Yamanaka, Toshiharu Ichimura, et Sota Hiraga. 1999. « Complex formation of MukB, MukE and MukF proteins involved in chromosome partitioning in Escherichia coli ». *The EMBO journal* 18 (21): 5873-84.

Yano, Koichi, Hideki Noguchi, et Hironori Niki. 2022. « Profiling a single-stranded DNA region within an rDNA segment that affects the loading of bacterial condensin ». *Iscience* 25 (12): 105504.

Yoshinaga, Mari, et Yuji Inagaki. 2021. « Ubiquity and origins of structural maintenance of chromosomes (SMC) proteins in eukaryotes ». *Genome Biology and Evolution* 13 (12): evab256.

Yuen, Kobe C., Brian D. Slaughter, et Jennifer L. Gerton. 2017. « Condensin II is anchored by TFIIIC and H3K4me3 in the mammalian genome and supports the expression of active dense gene clusters ». *Science advances* 3 (6): e1700191.

Zawadzka, Katarzyna, Pawel Zawadzki, Rachel Baker, Karthik V. Rajasekar, Florence Wagner, David J. Sherratt, et Lidia K. Arciszewska. 2018. « MukB ATPases are regulated independently by the N-and C-terminal domains of MukF kleisin ». *Elife* 7: e31522.

Zhao, Hang, April L. Clevenger, Phillip S. Coburn, Michelle C. Callegan, et Valentin V. Rybenkov. 2022. « Condensins are essential for Pseudomonas aeruginosa corneal virulence through their control of lifestyle and virulence programs ». *Molecular Microbiology* 117 (4): 937-57.