



HAL
open science

Mécanismes Moléculaires de la Condensation Mitotique des Chromosomes chez la levure *Schizosaccharomyces* *pombe*

Lydia Fauque

► **To cite this version:**

Lydia Fauque. Mécanismes Moléculaires de la Condensation Mitotique des Chromosomes chez la levure *Schizosaccharomyces pombe*. Biologie moléculaire. Université Claude Bernard - Lyon I, 2014. Français. NNT : 2014LYO10179 . tel-01127299

HAL Id: tel-01127299

<https://theses.hal.science/tel-01127299>

Submitted on 7 Mar 2015

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.

N° d'ordre : 179-2014

Année 2014

THESE

Délivrée par

L'UNIVERSITÉ CLAUDE BERNARD- LYON1

pour l'obtention

du DIPLOME DE DOCTORAT

soutenue publiquement

le 24 septembre 2014

par

Lydia FAUQUE

TITRE

**Mécanismes Moléculaires de la Condensation Mitotique des
Chromosomes chez la levure *Schizosaccharomyces pombe***

Directeur de thèse :

Pascal BERNARD

Membres du JURY : M. Laurent SCHAEFFER (président)
M. Yannick GACHET (rapporteur)
M. Jean Paul JAVERZAT (rapporteur)
M. Pascal BERNARD (examineur)
M. Marc LEMAIRE (examineur)
M. André VERDEL (examineur)

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier M. **Pascal Bernard** de m'avoir accueillie dans son équipe au sein du LBMC à l'ENS de Lyon lors de stages en master 1 et 2 et par la suite de m'avoir admise en tant que thésarde. Pascal, merci de m'avoir donnée cette opportunité. Je vous exprime toute ma gratitude pour la patience, la disponibilité et les conseils que vous avez portés à mon égard. Merci de m'avoir guidée, encadrée et encouragée durant toutes ces années. Je n'étais sans doute pas l'étudiante parfaite mais malgré toutes mes maladresses, grâce à vous, je ressortais toujours grandie de chacune de mes expériences. Je suis très heureuse d'avoir bénéficié de votre soutien, votre formation et d'avoir tant appris à vos côtés.

Je remercie les membres de mon jury de thèse, messieurs **Yannick Gachet** et **Jean Paul Javerzat** qui m'ont fait l'honneur d'être les rapporteurs de ma thèse, messieurs **Marc Lemaire** et **André Verdel** pour avoir accepté d'être examinateurs de ma thèse et M. **Laurent Schaeffer**, président de jury et directeur du LBMC. Je leur suis très reconnaissante du temps qu'ils ont passé à lire et évaluer mes travaux. Je remercie également messieurs **André Verdel** et **Gaël Yvert** pour leurs précieux conseils lors de mon comité de suivi de thèse, Mme **Marie Delattre** et son équipe pour les échanges scientifiques lors des lab-meetings, messieurs **Stéphane Janszarski**, **Hugues Parrinello** et **Jean-Pierre Devignes** pour leur collaboration aux travaux du crible, et M. **Christian Hearing** pour sa collaboration aux travaux de Gcn5.

Je remercie la **Ligue Nationale Contre le Cancer** qui m'a financée durant 3 ans. Je remercie l'ensemble du personnel technique LBMC, particulièrement **Claire Lionnet** et **Christophe Chamot** pour leurs conseils en microscopie et traitement d'images, et l'ensemble du personnel administratif du LBMC-UCBL-ENS et de l'ED BMIC. Merci à **Andrée Defours**, secrétaire du LBMC, qui a fait tout son possible pour trouver un financement les derniers mois de ma thèse, ce qui a permis à **Bénédicte Durant**, directrice de l'ED BMIC, d'accepter mon inscription en 4^e année de thèse.

Je remercie tous les membres de l'équipe P. Bernard, plus particulièrement **Esther Mollereau**, **Pénélope Legros** et **Vincent Vanoosthuyse** qui ont dû me supporter tout au long de ces années.

Esther et Péné, bien plus que de simples collègues, les filles merci pour vos efforts à faire régner le bien être des expériences du labo, votre écoute, votre aide expérimentale et vos conseils non seulement dans le cadre du labo mais aussi sur le plan personnel. Toujours prévoyante, toujours aux petits soins... au labo comme sur les pistes de ski, Esther j'ai adoré chipé avec toi, la mission sauvetage de Fabien (ski), les missions « cadeaux commerciaux » et nos étés lab. Maman Esther c'est un titre qui te va excellemment, tes enfants ont une super maman!!! Et Pourquoi tout ça ? Parce que Esther, elle gère ;) Et toi Péné, mon intelligence artificielle... Tant de fois tu m'as fait éclater de rire, chanter et tant de fois tu m'as consolée. Merci pour tous ces moments. Pas de doute, nous formions le duo de choc 'Legros Fauque'... Nous étions faites pour aller ensemble.

Quant à toi Vincent ou encore Mac/Tonton Sthuyse, merci pour tous tes bons conseils scientifiques, tes chansons à paroles captivantes, tes anecdotes et ton humour. « Dans les plaines du Far West, quand vient la nuit, les cowboys près du bivouac sont réunis et

se grattent les narines en pensant à leur petite cousine, la Marie, la mère de Jésus Christ » ou encore « Chaud cacao, Cho Cho Chocolat ! ».

Je remercie également les membres de l'équipe précédents, je pense à **Lorelei, Xavier, Morgane, Pauline et Lia**. Lore et Pauline pour leur amitié et Xavier, Morgane et Lia pour leur collaboration. Egalement, une pensée pour **Clémence** qui commence son doctorat.

Une pensée à tout le personnel LBMC/IGFL/Viro que j'ai pu côtoyer, avec qui j'ai pu discuté autour d'un café, d'un goûter, d'une cigarette, ou tout simplement dans les couloirs. Merci à **Julie** pour m'avoir permis de co-organiser le forum Today 2012 étudiant avec elle et Baptiste, ce fut une superbe expérience. Merci **aux « filles »** et **Jérôme** avec qui j'ai passé de bons moments et avec une mention toute particulière à **Lama**, THE représentant des doctorants LBMC ! Toujours de bonne humeur, toujours à l'écoute et toujours aux petits soins de chacun... certes avec beaucoup de cheveux et parfois un accent indo-libanais, elle est adorable mais il faut faire tout de même attention car « Quand Lama pas content, Lama crache ! ». Lama je tiens également à te remercier pour tous nos goûters légumes/fruits tout au long de ma grossesse, les gens que tu m'as fait rencontrer, ton soutien et ton amitié !

Je remercie également tous mes amis avec qui j'ai grandi... Tout a commencé un 30 avril 86 en Corée, où l'on me donna le nom de Kim Soo Hwa. Soo Hwa signifie fleur d'exception. Telle une fleur peu ordinaire j'ai grandi avec des racines coréennes dans un terreau français, arrosée par beaucoup d'amour. Telle une fleur, j'ai des pétales et chacun de ces pétales représente de belles amitiés pour être une fleur épanouie.

Mon pétale Cheval

Mes amies du cheval, de Pierrelatte, Val, Soso, Mimi, Cat & Nad, qui sont mes grandes sœurs de cœurs, je les remercie pour leur amitié hors norme et un merci tout particulier à Val pour m'avoir toujours fait confiance pour monter ses chevaux comme si c'était les miens depuis mon adolescence ! Une énorme pensée aux morues du didou, Titi, Tongtong, Marie K, Vio, Tifouf & Jess que j'ai rencontrées à l'ASUL avec qui il est toujours agréable de se retrouver pour une soirée poney/morues.

Mon pétale Pierrelattin

Des amis de plus longue date, mes amis d'enfances, de primaire, de collège et lycée que je remercie pour m'avoir supportée toutes ces années maternelle/primaire/ collège/fac et encore aujourd'hui. Avec une pensée plus plus à Reneux et Cc !

Mon pétale Lyonnais

Kro et Charlouze, amis de prépa avec qui on passe toujours de bons moments souvent très très drôles. Et oui les non dits sont toujours un jour ou l'autre dits ! Merci à Noun, une simple pote de fac devenue une superbe amie. Qui l'aurait cru ! Ma Noun, dans les bons ou les mauvais plans, toujours présente... merci pour ta solidarité, ta confiance, tes conseils, ton écoute et pour tout le reste... les mots ne suffiraient pas. Je pourrais écrire une thèse sur toi... Je remercie Carole & Zérôme pour leur amitié, les soirées barbec, l'année où j'ai monté M, l'apprentissage du coréen et les ballades des benzous. Je remercie mes amis du cours de Coréens : Béné, Carole, Mutmut, Sandra, Sarah, Cyrille, Mika (devenu mon prof d'Hapkido) et les profs InSeon et Yumi. Je remercie tous mes

amis labo et de promo, re Lama, re Esther, re Péné, Lulu, JC, Lucie, Jérôme. Je remercie également les amis de Etera, pas vraiment lyonnais mais rencontrés sur Lyon, pour tous les bons moments passés ensemble et les sorties canyoning, je pense notamment à Jacobo, Inaki, Simone, Thuy-Lan, Troy & Mai-Anh, Fanny et Mathieu.

Mon pétale Franco-Coréen

Béné, Mat & Mathilde ; Ber, Bij & Sandro, Misun & Franck, Jim, Mutmut, Zina, Isa, Marie ... une grande famille. Merci à toutes ces personnes, c'est toujours un plaisir de passer un moment tous ensemble, autour des tables de Misun qui sont toujours des régals, de piques niques gastronomiques ou encore après midi goûter, avec une mention toutes particulière à notre organisatrice des troupes Béné !

Mon pétale InKAS

Nous étions 40 coréens adoptés issus des 4 coins du monde à avoir eu l'opportunité de visiter notre motherland en 2012 avec InKAS. Ce voyage m'a permis de superbes rencontres et découvrir un peu mieux qui je suis. Merci à Amandine et Déborah pour m'avoir parlé de cette association InKAS, merci à toutes ces personnes et organismes qui offrent à, nous les adoptés, une expérience en or pour découvrir nos origines et rencontrer des gens comme nous.

Mon pétale Cousinade

Je remercie toute ma famille et amis de mes parents pour leur soutien et les bons moments. Une pensée toute particulière à tonton Roger, tatie Monique, mes cousines Christelle et Isabelle, M&Mme Hette, et à ma grand-mère de cœur Yvette.

Je remercie Etera, mon doudou, mon tahitien, mon physicien... mon homme qui m'a soutenue tout au long de l'écriture de ce manuscrit tout au long de mon congé maternité et de l'aboutissement de ce doctorat. Merci mon dou pour tous tes conseils. Merci de partager chaque jour à mes côtés et de t'occuper de moi telle une princesse. Merci d'avoir rendu possible notre plus belle expérience biophysique jamais réalisée... notre Tahia, notre bébinette d'amour qui rend nos jours encore plus beaux qu'ils ne les étaient. Je remercie également toute la famille de Etera, tout particulièrement Calixte et Jenny.

Enfin, je remercie les personnes les proches dans mon cœur, sans qui, rien ne serait arrivé, mes parents. Maman, papa, je vous remercie de tout l'amour que vous me portez, de tout votre soutien, votre fierté, votre confiance. Merci pour m'avoir rendue... une fleur épanouie.

REMERCIEMENTS	3
RÉSUMÉ.....	13
CHAPITRE I : INTRODUCTION GÉNÉRALE	15
I- LA MITOSE.....	15
A. <i>Description cytologique.....</i>	<i>15</i>
1. La prophase.....	17
2. La prométaphase	17
3. La métaphase.....	17
4. L'anaphase.....	19
5. La télophase	19
B. <i>Régulation biochimique</i>	<i>19</i>
1. Entrée en mitose	21
2. Sortie de mitose.....	21
3. Notion de points de contrôle	23
3.1 Le SAC (Spindle Assembly Checkpoint).....	23
3.2 Le point de contrôle « NoCut »	27
II- LA CHROMATINE, UNE STRUCTURE DYNAMIQUE.....	29
A. <i>Assemblage du nucléosome</i>	<i>29</i>
1. Description du nucléosome.....	29
2. Assemblage <i>de novo</i>	31
B. <i>Les niveaux d'organisation de la chromatine.....</i>	<i>33</i>
1. Fibre de 11 nm.....	33
2. Euchromatine et hétérochromatine	37
3. Structure du chromosome mitotique	39
C. <i>Dynamique de la chromatine.....</i>	<i>41</i>
1. Le remodelage de la chromatine.....	43
2. Les modifications post traductionnelles des histones	45
3. Les variants d'histones.....	49
4. Les ARN non codants	49
5. Organisation spatiale du génome dans le noyau	51
III- LA CONDENSATION MITOTIQUE	51
A. <i>Rôles et dynamique de la condensation mitotique.....</i>	<i>51</i>
B. <i>Facteurs de condensation.....</i>	<i>53</i>
1. Topoisomérase II	53
2. Les condensines	55
3. RCA (Regulator of Chromosome Architecture).....	55
4. La protéine Kif4.....	57

5.	Autres facteurs de condensation	59
5.1	Les polyamines	59
5.2	La protéine Trf 4	59
5.3	Les protéines pRB	61
5.4	La protéine Wpl 1	61
IV-	LES COMPLEXES CONDENSINE	63
A.	<i>Les activités de condensine</i>	63
1.	Activité de super- enroulement et de décaténation de l'ADN double brin	63
2.	Assemblage du chromosome métaphasique	65
3.	Maintien de l'architecture chromosomique en anaphase	67
4.	Autres fonctions	69
4.1	Rôle méiotique	69
4.2	Rôle interphasique	71
4.3	Cas de <i>C. elegans</i> : Condensine I ^{DC} (dosage compensation)	73
B.	<i>Fonctionnement moléculaire des complexes SMC</i>	75
1.	Les protéines SMC	77
2.	La cohésine	77
3.	Les condensines	81
4.	Le complexe Smc5-6	81
5.	Le complexe SMC bactérien « condensin like »	83
C.	<i>Association des condensines à la chromatine</i>	85
1.	Localisation des condensines	85
1.1	Condensine I	85
1.2	Condensine II	87
1.3	Mode d'association topologique	87
2.	Les sites d'association chromosomiques des condensines et les différents mécanismes de recrutement	
	93	
2.1	Cartographie des condensines I et II	93
2.2	Mécanismes de chargement multiples et indépendants	95
D.	<i>Régulation des condensines</i>	99
1.	Régulation par les kinases CDK1/Cdc2 et Polo PLK1/cdc5	101
2.	Régulation par Aurora B/Ipl1	103
3.	Régulation par CKII	103
4.	Régulation par les phosphatases	105
5.	Régulations par acétylation et sumoylation	105
V-	MODIFICATION DE LA CHROMATINE, CONDENSATION DES CHROMOSOMES ET ASSOCIATION DES	
	CONDENSINES	107
VI-	LIEN ENTRE CONDENSATION ET TRANSCRIPTION	109
VII-	PROBLÉMATIQUE ET OBJECTIFS	115
CHAPITRE II :	MATÉRIELS ET MÉTHODES	117
I-	MATÉRIEL BIOLOGIQUE	117

A.	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	117
1.	La souche <i>cut3-477 pREP41-cut3+</i>	117
2.	Les souches mutantes.....	119
B.	<i>Bactéries électrocompétentes Escherichia Coli</i>	119
II-	MÉTHODES.....	119
A.	<i>Méthode de culture</i>	119
1.	Milieu de culture.....	119
1.1	<i>S. pombe</i>	119
1.2	<i>E. Coli</i>	121
2.	Condition des cultures liquides.....	121
3.	Cultures des mutants <i>nda3-KM311</i>	121
B.	<i>Méthode génétique</i>	123
1.	Mutagenèse aléatoire à l'Ethyle Methane Sulfonate (Fait par P.B et X. R).....	123
2.	Test en gouttes (TEG).....	123
3.	Croisement.....	123
3.1	Analyses des spores en vrac.....	125
3.2	Analyses de tétrades.....	125
4.	Isolement de souches diploïdes.....	125
C.	<i>Techniques de génétique et biologie moléculaire</i>	127
1.	Transformation de <i>S. pombe</i>	127
2.	Transformation de <i>E. Coli</i>	129
3.	Préparation d'ADN.....	129
3.1	Extraction d'ADN génomique de <i>S. pombe</i>	129
3.2	Extraction plasmidique à partir de <i>E. coli</i>	131
4.	Préparation des ARNs.....	131
4.1	Extraction des ARNs.....	131
4.2	Digestion des ARNs.....	133
4.3	Reverse Transcription.....	133
4.4	Détermination du niveau d'expression d'un gène d'intérêt.....	133
5.	Mutagenèse dirigée pour construire des souches <i>cut14</i> non acétylables ou constitutivement acétylée et des souches <i>cut3</i> non acétylables.....	133
D.	<i>Analyse des protéines</i>	135
1.	Extraction en condition dénaturante.....	135
2.	Immunoprécipitation (IP).....	137
2.1	Extraction de protéines en version native.....	137
2.2	Immunoprécipitation sur les lysats clarifiés.....	137
3.	Co-immunoprécipitation (Co-IP).....	139
3.1	Récoltes des culture.....	139
3.2	Lyse cellulaire.....	139
3.3	Préparation des billes.....	139
3.4	Co-immunoprécipitation sur les lysats clarifiés.....	139
4.	Western blot.....	141

4.1	Electrophorèse des protéines	141
4.2	Transfert des protéines sur membrane.....	143
4.3	Immunoblot	143
E.	Protéines associés à la chromatine	145
1.	Immufluorescence sur étalement de la chromatine.....	145
1.1	Préparation des sphéroplastes.....	145
1.2	Etalement de la chromatine.....	147
1.3	Immunofluorescence indirecte sur la chromatine étalée sur une lame de verre.....	147
1.4	Coloration de l'ADN au DAPI et montage des lames	151
1.5	Détections et quantifications de la fluorescence des protéines associées à la chromatine	151
2.	Immunoprécipitation de chromatine (ChIP).....	153
2.1	Fixation et Récoltes des cellules	153
2.2	Préparation de la chromatine	153
2.3	Préparation des billes magnétiques dynabeads	155
2.4	Les Immunoprécipitations (IP)	155
2.5	Détermination du pourcentage d'ADN immunoprécipité en des régions spécifiques.....	157
F.	Analyses cytologiques.....	159
1.	Immunofluorescence indirecte.....	159
1.1	Fixation des cellules au paraformaldéhyde(pFA).....	159
1.2	Perméabilisation des cellules.....	159
1.3	Immunofluorescence.....	159
1.4	Coloration de l'ADN au DAPI	161
2.	Fluorescence directe	161
3.	Montage entre lame et lamelle	163
4.	Microscopie	163
5.	Analyse des images.....	163

CHAPITRE III : CRIBLE GÉNÉTIQUE POUR DES MUTATIONS SYNTHÉTIQUEMENT LÉTALES

AVEC <i>CUT3-477</i>.....	165
I- PRINCIPE.....	165
A. <i>Principe de la colétalité</i>	165
B. <i>Le mutant <i>cut3-477</i></i>	167
C. <i>Le crible</i>	169
II- ISOLEMENT DES SOUCHES <i>SLC</i>	171
A. <i>Mutations non pertinentes attendues</i>	171
B. <i>Isolement des souches</i>	173
III- PHÉNOTYPES MACROSCOPIQUES ADDITIONNELS DES MUTANTS <i>SLC</i>	175
A. <i>Hypersensibilité au thiabendazole</i>	175
B. <i>Hypersensibilité au stress génotoxique : HU et UV-C</i>	177
C. <i>Thermosensibilité, cryosensibilité</i>	179
IV- ANALYSES GÉNÉTIQUES.....	179

A.	<i>Groupes de liaison génétique</i>	179
1.	Groupes de liaisons entre les mutations <i>slc</i>	179
2.	Test de liaison entre les mutations <i>slc</i> et des gènes de condensations connus	181
B.	<i>Dominance et récessivité</i>	181
C.	<i>Groupes de complémentation</i>	183
D.	<i>Expression des gènes de condensation dans les mutants <i>slc</i></i>	185
V-	ANALYSES CYTOLOGIQUES	187
A.	<i>La mitose chez <i>S. pombe</i></i>	187
B.	<i>Les cellules mutantes <i>slc</i> montrent des défauts de ségrégation des chromosomes évoquant les mutants de condensine</i>	191
C.	<i>Import nucléaire de condensine chez le mutant <i>slc47</i></i>	193
VI-	IDENTIFICATION DES MUTATIONS <i>SLC</i>	195
A.	<i>Par complémentation fonctionnelle</i>	195
B.	<i>Par séquençage du génome</i>	197
VII-	CAS DU SUPPESSEUR DE <i>CUT3-477</i> : <i>SUP122</i>	199
A.	<i>Caractérisation initiale du mutant <i>sup122</i></i>	199
1.	Phénotypes macroscopiques	201
2.	Test de liaison	201
3.	La mutation <i>sup122</i> restaure partiellement la migration des chromosomes dans un fond génétique <i>cut3-477</i> 203	
B.	<i>Identification du gène <i>nut2</i></i>	203
CHAPITRE IV- GCN5 ET L'ASSOCIATION DE CONDENSINE À LA CHROMATINE		207
I-	INTRODUCTION SUR GCN5/GCN5, CO-ACTIVATEUR DE LA TRANSCRIPTION	209
A.	<i>Découverte de la protéine <i>Gcn5</i></i>	209
B.	<i>Structure de <i>Gcn5</i>, une protéine conservée</i>	211
C.	<i><i>Gcn5</i>, sous unité du complexe SAGA</i>	211
1.	Le complexe SAGA co-activateur de la transcription	213
2.	SAGA régule la transcription	217
3.	Le module HAT	219
4.	<i>Gcn5</i> acétyle également des protéines non histones	219
II-	CARACTÉRISATION INITIALE DE GCN5 VIS À VIS DE LA CONDENSATION MITOTIQUE DES CHROMOSOMES	221
A.	<i><i>Gcn5</i> est essentielle lorsque <i>Cut3</i> est partiellement déficiente</i>	221
B.	<i><i>Gcn5</i> est nécessaire à la ségrégation des bras de chromosomes</i>	221
1.	Analyse de la ségrégation des chromosomes avec marquage des centromères et SPB chez le mutant <i>gcn5-47</i>	223
2.	Essai de condensation chez le mutant <i>gcn5-47</i>	225
C.	<i>Interaction entre <i>gcn5</i> et <i>cut3</i> est spécifique</i>	227

1.	Expression des gènes de condensation dans les mutants <i>gcn5</i>	227
2.	Expression de <i>cnp3</i> et <i>abp2</i>	229
3.	Intégrité du complexe condensine dans le mutant <i>gcn5Δ</i>	229
4.	Interactions génétiques entre les sous unités du complexe SAGA et <i>cut3-477</i>	231
5.	Spécificité de l'interaction fonctionnelle entre Gcn5 et Cut3/condensine.....	231
6.	Interaction fonctionnelle entre Gcn5 et d'autres protéines de condensation.....	233
D.	<i>Gcn5</i> assiste la fixation de condensine à la chromatine.....	235
1.	Association de condensine à la chromatine dans les mutants <i>gcn5</i> par chromosome spreads.....	237
2.	Association de condensine à la chromatine dans les mutants <i>gcn5</i> par ChIP suivi de qPCR sur cellules synchronisées en prométaphase par arrêt <i>nda3-KM311</i>	239
3.	Gcn5 ne semble pas interagir avec condensine en prométaphase.....	241
III-	RÔLE DE GCN5 DANS LA CONDENSATION MITOTIQUE DES CHROMOSOMES.....	241
A.	<i>Gcn5</i> ne semble pas être responsable de l'acétylation de la lysine K114 de Cut14 ou des lysines K348 et K1069 de Cut3.....	243
1.	Données sur les sites lysines acétylées des sous unité SMC.....	243
2.	Construction et analyses des mutants non acétylables de <i>cut3</i>	245
3.	Construction et analyses du mutants non acétylation ou mimant une acétylation constitutive de <i>cut14K114</i>	247
B.	L'acétylation de H3K9 est nécessaire à la fixation de condensine.....	247
1.	Colétalité entre les histones non acétylables et <i>cut3-477</i>	249
1.1	H3K9R, K14R, S10A phénocopie Gcn5.....	249
1.2	Restauration de la viabilité du mutant <i>gcn5Δ cut3-477</i> par la délétion de protéines HDAC.....	251
1.3	Association du Cnd2 dans les mutants d'histones <i>h3-K9R-K14R</i>	251
2.	L'association chromosomique de Gcn5 est réduite mais persiste en mitose,.....	253
2.1	Association de H3K9ac, H3K14ac et H3K18ac à la chromatine en mitose.....	255
C.	Conclusion II :.....	257
	CHAPITRE V : DISCUSSION GÉNÉRALE.....	259
	BIBLIOGRAPHIE.....	281
	ANNEXE.....	339

Résumé

La transmission des chromosomes lors des divisions nucléaires repose sur un ensemble de mécanismes conservés. L'instabilité chromosomique est un moteur de l'oncogenèse. Comprendre les mécanismes moléculaires qui assurent une transmission fidèle de l'information génétique est donc un enjeu de santé humaine. La condensation mitotique des chromosomes est l'un de ces mécanismes. Parmi les facteurs clefs de ce mécanisme, on trouve les complexes condensines. Ces complexes sont des ATPases chromosomiques ubiquitaires, indispensables à cette condensation. L'association des condensines à la chromatine est nécessaire à la condensation mitotique. Cependant, les mécanismes par lesquels ces complexes s'associent aux chromosomes et contribuent à leur condensation de façon régulée sont mal compris. Ceci est dû en partie au fait que nous ne connaissons pas l'ensemble des facteurs impliqués dans ce processus. L'objectif de ma thèse était d'identifier et de caractériser des facteurs de condensation encore inconnus collaborant avec condensine chez la levure *Schizosaccharomyces pombe*. Par un crible génétique, nous avons recherché des mutants viables lorsque condensine est complètement fonctionnelle mais morts lorsque condensine est partiellement déficiente. Nous avons ainsi identifié 7 protéines jusqu'alors jamais décrites comme impliquées dans la condensation mitotique des chromosomes. Parmi ces protéines, nous avons identifié des facteurs impliqués dans le remodelage de la chromatine, liés à la transcription et Gcn5, une histone acétyl-transférase très conservée, connue pour son rôle de co-activateur de la transcription. Gcn5 s'associe à la chromatine au niveau des promoteurs des gènes où elle acétyle principalement les histones H3K9, H3K14 et H3K18. Sa présence au niveau des promoteurs est directement corrélée avec le niveau de transcription des gènes correspondants. Bien que la majorité de la chromatine soit déacétylée et que la présence de Gcn5 réduite au niveau des chromosomes en mitose, des traces de H3K9 acétylée persiste au niveau de certains promoteurs. Nos résultats suggèrent que cette acétylation persistante est nécessaire au recrutement de condensine à la chromatine.

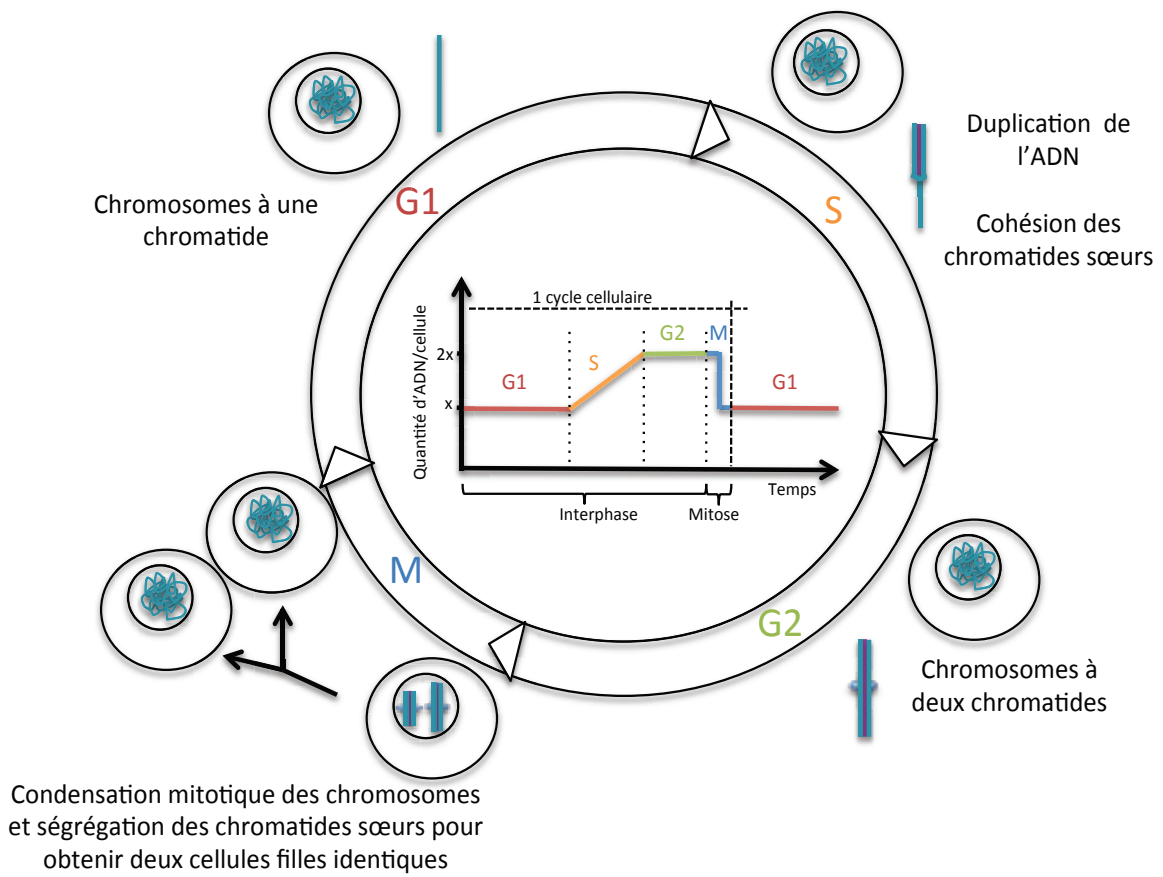


Figure 1. Représentation schématique du cycle cellulaire.

Chapitre I : Introduction Générale

I- La mitose

Chez les eucaryotes, le cycle cellulaire est divisé en quatre phases successives, G1, S, G2 et M. Les phases G1, S et G2 (G pour Gap, S pour Synthèse) constituent l'interphase. Pendant les phases d'intervalles G1 et G2, les cellules se préparent pour les phases S et M (Mitose), respectivement. La phase S se caractérise par la duplication de l'ADN et l'établissement de la cohésion entre les chromatides sœurs, et la phase M par la condensation des chromosomes et la séparation des chromatides sœurs. Les chromosomes subissent ainsi quatre changements structuraux majeurs au cours du cycle cellulaire : la duplication, la cohésion, la condensation mitotique et la séparation des chromatides sœurs (Figure 1).

A. Description cytologique

En 1882, W. Flemming publie ses travaux décrivant pour la première fois la mitose (ou division nucléaire indirecte) dans le livre *Zellsubstanz, Kern und Zelltheilung* (Substance cellulaire, noyau et division cellulaire). Il observe la formation de segments filamenteux nucléaires qui se divisent en deux lots entraînés dans des directions opposées, puis répartis dans les deux cellules filles pendant la division cellulaire. Il nomme ces segments chromosomes (Paweletz 2001).

La mitose, du grec *mitos* : filament, est le processus au cours duquel une cellule se divise pour produire deux cellules filles ayant chacune le même patrimoine génétique que la cellule mère. Elle se compose de cinq étapes : prophase, prométaphase, métaphase, anaphase et télophase. Ces étapes sont illustrées dans la figure 2. Elles ont été décrites chez les eucaryotes par McIntosh et McDonald (McIntosh et McDonald 1989).

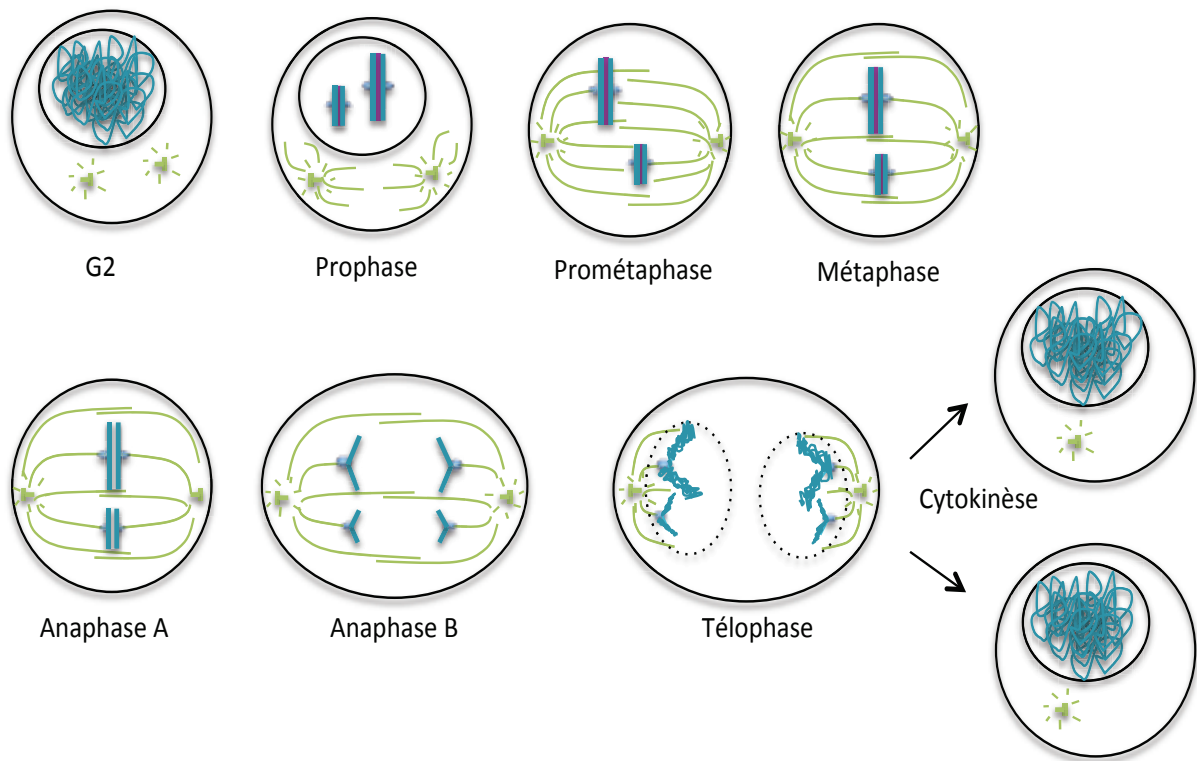


Figure 2 Représentation schématique des étapes de la mitose.

En bleu la chromatine, en vert les microtubules et centrosomes, en violet la cohésion des chromatides sœurs.

1. La prophase

La mitose débute avec la prophase, où les fibres de chromatine interphasique se condensent et se réorganisent pour former des chromosomes individualisés. Les microtubules cytoplasmiques sont dépolymérisés. Les deux centrosomes frères migrent vers les pôles opposés de la cellule et émettent des microtubules dans toutes les directions.

2. La prométaphase

La prométaphase est généralement marquée par la rupture de l'enveloppe nucléaire et l'attachement des chromosomes aux microtubules via leurs kinétochores. Chez certaines espèces fongiques dont les levures, il n'y a pas de rupture de l'enveloppe nucléaire. Le fuseau mitotique s'assemble alors dans le noyau.

En prométaphase, les chromosomes apparaissent sous la forme de deux chromatides sœurs (résolution des chromatides sœurs) maintenues associées sur toute leur longueur (cohésion des chromatides sœurs). Un complexe protéique transitoire, appelé kinétochore, est assemblé au niveau des centromères. C'est par son intermédiaire que les microtubules accrochent les chromosomes. Chaque chromatide sœur possède un kinétochore frère. Et chacun des kinétochores frères capture les extrémités positives des microtubules. Si un kinétochore interagit avec des microtubules provenant d'un des deux pôles opposés, son kinétochore frère interagit avec les microtubules provenant du pôle opposé. Les chromosomes sont ainsi attachés de façon bilatérale au fuseau mitotique, on parle d'attachement bi-orienté ou bilatéral des chromosomes. Les microtubules associés aux kinétochores sont qualifiés de microtubules kinétochoriens ; ces microtubules sont orientés, avec leur extrémité positive ancrée au kinétochore et leur extrémité négative ancrée au centrosome.

3. La métaphase

Après une série d'oscillations, les chromosomes s'alignent selon l'axe équatorial du fuseau, formant la plaque métaphasique. Ce mouvement est dû aux forces exercées par les microtubules kinétochoriens tendant à séparer les centromères qui s'opposent à la

cohésion des chromatides sœurs. Les chromosomes sont alors parfaitement structurés et hautement condensés.

4. L'anaphase

La transition métaphase-anaphase est marquée par la séparation des chromatides sœurs (anaphase A) et l'élongation du fuseau (anaphase B). L'anaphase B ne commence pas forcément après l'anaphase A, un chevauchement temporel des deux évènements est possible. Au cours de l'anaphase A, la cohésion des chromatides sœurs est rompue et les extrémités positives des microtubules kinétochoriens dépolymérisent; ce qui engendre la traction des chromatides sœurs vers les pôles opposés. Au cours de l'anaphase B, le fuseau s'allonge augmentant la distance entre les deux lots de chromosomes.

5. La télophase

La télophase marque la fin de la mitose, le fuseau se désassemble, les chromosomes décondensent et les noyaux se reforment. Parallèlement, la cytokinèse (division du cytoplasme) se déroule où un anneau contractile se resserre progressivement et conduit à la séparation des deux cellules filles.

B. Régulation biochimique

Deux grandes classes de protéines régulent le cycle cellulaire : les protéines Cdk (cycline dependent kinase) et leurs phosphatases antagonistes. Les protéines Cdk forment des hétérodimères associées aux cyclines, constituant les sous unités régulatrices des Cdk. Les différentes combinaisons cycline-Cdk déterminent les protéines cibles. Associée à une cycline, une protéine Cdk phosphoryle des protéines spécifiques à un moment donné du cycle cellulaire afin de permettre la progression des cellules d'une phase du cycle cellulaire vers une autre phase. Les Cdk sont constitutivement exprimées alors que les cyclines sont synthétisées à des étapes spécifiques du cycle cellulaire puis rapidement dégradées (Nurse 2000). L'activation du complexe cycline-Cdk dépend

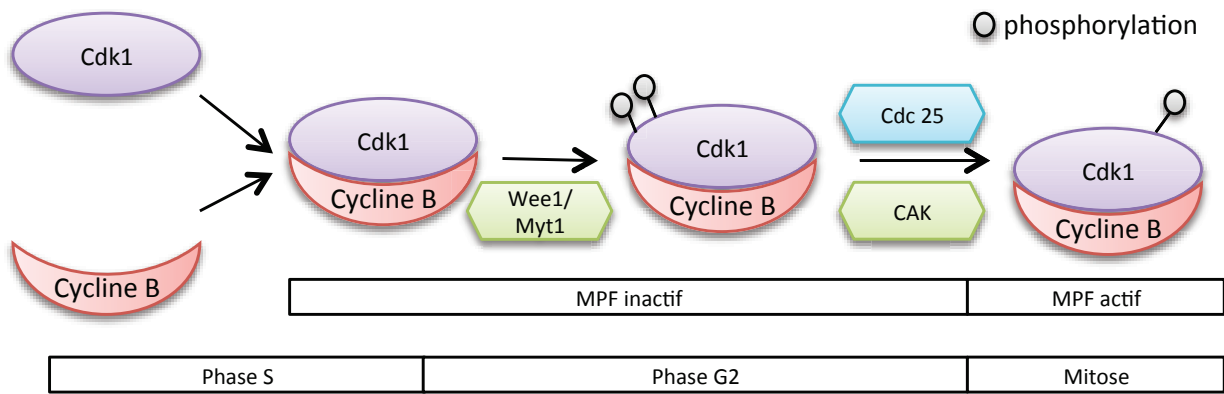


Figure 3 Formation et activation du complexe MPF.

Composé de Cdk1 et de la cycline B, le MPF est régulé par des phosphorylations inhibitrices par Wee1/Myt1 ou activatrices par la CAK.

également du niveau de phosphorylation de la sous unité Cdk, lequel est déterminé par les kinases Wee1/Myt1 et la phosphatase Cdc25.

1. Entrée en mitose

L'entrée en mitose est provoquée par l'activation du complexe MPF (Maturation Promoting Factor) composé de Cdk1-cycline B (Cdc2-Cdc13 chez *S. pombe*). Cdk1 s'associe à la cycline B en interphase (phase S/G2) mais le complexe formé est inactif car la sous unité Cdk1 est inhibée par des phosphorylations inhibitrices sur les résidus thréonine 14 et tyrosine 15 déposées par la protéine Wee1/Myt1 (Lindqvist, Rodríguez-Bravo, et Medema 2009). L'activation du MPF est induite par la déphosphorylation de ces deux résidus par la phosphatase Cdc25 et la phosphorylation de la thréonine 161 par l'enzyme CAK (Cdk activating kinase) (Figure 3). Le MPF actif initie alors la mitose en agissant positivement sur la condensation des chromosomes, la rupture de l'enveloppe nucléaire, l'activité de nucléation des centrosomes et le changement de dynamique des microtubules. L'activité du MPF est maintenue jusqu'en anaphase (Clute et Pines 1999).

2. Sortie de mitose

Lorsque que tous les chromosomes sont bi-orientés, l'APC/C^{Cdc20} (anaphase-promoting complex/cyclosome) ubiquitile la cycline B, laquelle est alors adressée au protéasome afin d'être dégradée. La dégradation de la cycline B déclenche la sortie de mitose. Cet événement est contrôlé par un point de contrôle appelé SAC (spindle assembly checkpoint) que je décris dans le chapitre I-I-B-3 «notion de point de contrôle». La sortie de mitose est marquée par deux évènements : la dissociation des chromatides sœurs et la dégradation du MPF (Figure 4).

La séparase est l'enzyme qui induit la disjonction de chromatides sœurs en clivant les anneaux de cohésines au niveau de leur sous unité kleisine (Figure 4A). L'action de la séparase est déclenchée par la dégradation de sa protéine chaperonne inhibitrice, appelée la sécurine, et la perte d'une phosphorylation inhibitrice sur le résidu sérine

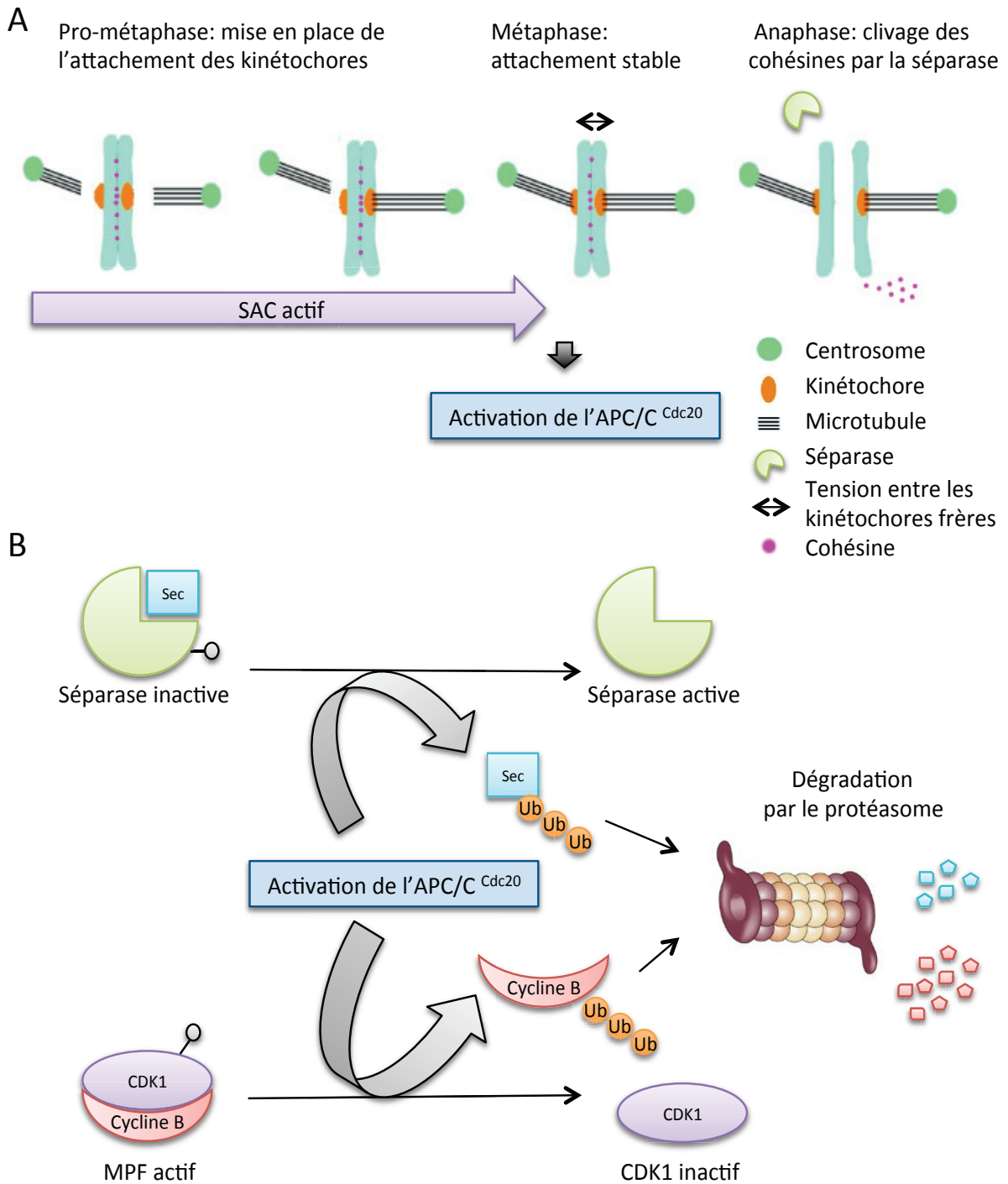


Figure 4. Régulation de la mitose.

A. L'attachement des kinétochores au fuseau se réalise durant la prométaphase. Le SAC est actif jusqu'à ce que les chromosomes soient bi-orientés et attachés de façon stable. L'inactivation du SAC engendre l'activation de l'APC/C^{Cdc20}. L'anaphase est marquée par le clivage des cohésines par la séparase. **B.** L'APC/C adresse la sécurine (Sec) et la cycline B au protéasome par poly-ubiquitinylation. Les résidus ubiquitines sont représentés par les ronds « Ub » en orange et les résidus phosphates par des ronds gris.

1126 créée par le MPF (Stemmann et al. 2001). Lors de la transition métaphase/anaphase, l'APC/C^{Cdc20} induit la destruction de la sécurine, ce qui libère la séparase (Figure 4B). La séparase clive les cohésines, éliminant la cohésion et déclenchant la séparation des chromatides sœurs. L'APC/C^{Cdc20} induit également la destruction de la cycline B (Figure 4B), ce qui élimine la phosphorylation de la séparase (Stemmann et al. 2001) et augmenterait son activité protéolytique.

L'inactivation du MPF entraîne la sortie de la mitose. Les substrats de Cdk1 sont déphosphorylés par des sérine/thréonine phosphatases, telles que PP1 et PP2A dans les cellules humaines (De Wulf, Montani, et Visintin 2009). Chez *S. cerevisiae*, la protéine Cdc14 est également impliquée dans la sortie de mitose (Bardin et Amon 2001; Stegmeier et Amon 2004). Cdc14 est séquestrée dans le nucléole, et éloignée de ses substrats, jusqu'en fin de métaphase. En début d'anaphase, son activation est contrôlée par le système FEAR (fourteen early anaphase release) qui lui donne accès au nucléoplasme afin de déphosphoryler les substrats de Cdk1. Puis en milieu d'anaphase, elle est contrôlée par le système MEN (mitotic exit network) pour la complétion de la cytokinèse (Weiss 2012). L'absence de Cdc14 induit un arrêt du cycle cellulaire en télophase. Cependant l'utilisation d'inhibiteur de Cdk1 permet de lever cet arrêt. Néanmoins, dans ce cas, la cellule fille ne se sépare pas de la cellule mère. La voie MEN a un rôle essentiel dans la cytokinèse. Chez *S. pombe*, l'équivalent du système MEN est le système SIN (septation initiation network) qui contrôle la protéine Flp1 (orthologue de Cdc14) impliquée dans la formation de l'anneau contractile lors de la cytokinèse (Bedhomme et al. 2008).

3. Notion de points de contrôle

3.1 Le SAC (Spindle Assembly Checkpoint)

L'attachement correct des chromosomes au fuseau mitotique est indispensable au déclenchement de l'anaphase. L'inspection de cet attachement représente un point de contrôle important au cours de la mitose.

Un point de contrôle appelé le SAC, pour spindle assembly checkpoint, inhibe l'entrée en anaphase tant que l'attachement des chromosomes au fuseau n'est pas correct (Figure 5,

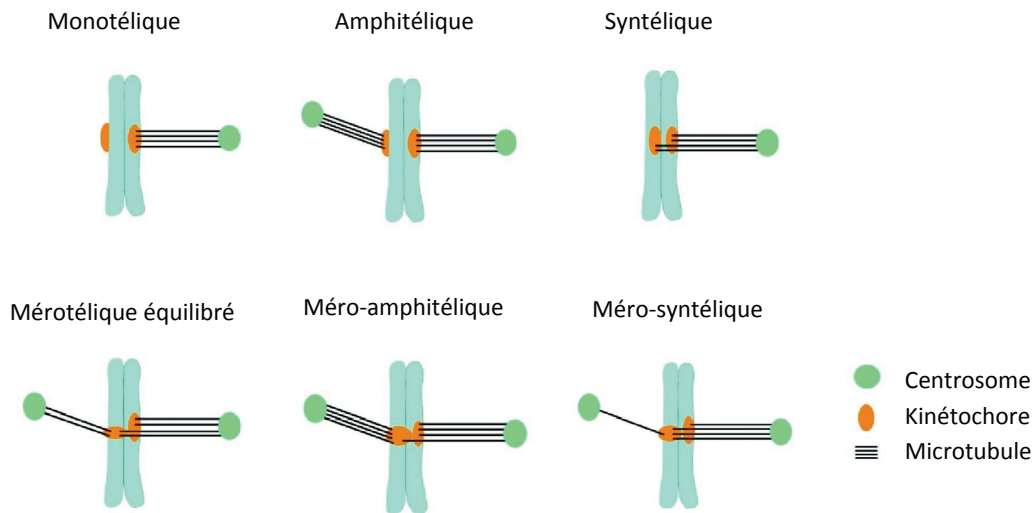


Figure 5. Représentation schématique de l'attachement des kinétochores aux microtubules en mitose.
Schéma extrait et modifié de (Gregan et al. 2011).

attachement amphitélique). Le SAC se compose essentiellement des protéines Mad (mitotic arrest deficient) et Bub (budding uninhibited by benzimidazole) telles que Mad1, Mad2, Mad3 (BUBR1 chez l'Homme), Bub1 et Bub3. En prométaphase, toutes les protéines du SAC et Cdc20 sont localisées au niveau des kinétochores non attachés. Cdc20 se lie à Mad2, BubR1 et Bub3 formant le complexe MCC (mitotic checkpoint complex) (Musacchio et Salmon 2007). Le MCC s'associe à l'APC/C inhibant son activité de poly-ubiquitinylation. L'activation de l'APC/C nécessite le désassemblage du MCC. Lorsque tous les chromosomes sont bi-orientés, les protéines du SAC se dissocient des kinétochores, libérant Cdc20 qui peut alors activer l'APC/C pour l'entrée en anaphase.

Le SAC est maintenu activé tant que tous les kinétochores ne sont pas attachés au fuseau et qu'il n'y a pas de tension entre les kinétochores frères, comme c'est le cas pour un attachement mono-orienté. Il en existe deux types (Figure 5): l'attachement monotélique, stade intermédiaire où un seul kinétochore frère est relié aux microtubules issus d'un même centrosome ; et l'attachement syntélique, attachement aberrant où les deux kinétochores frères sont attachés aux microtubules provenant d'un même centrosome. Cependant les attachements aberrants bi-orientés, dits mérotéliques (Figure 5, ligne du bas), où un kinétochore frère est attaché aux deux pôles, ne sont pas détectés par le SAC. C'est la protéine kinase Aurora B qui joue un rôle essentiel dans la correction de ces attachements. En l'absence de tension entre les kinétochores frères (syntélie ou mérotélie), Aurora B phosphoryle les protéines du kinétochore de façon à déstabiliser l'attachement des microtubules kinétochoriens (Gregan et al. 2011). Lorsque l'attachement est correct (amphitélique), les microtubules exercent une force qui tend à séparer les centromères. La cohésion des chromatides sœurs s'oppose à cette force, la tension est générée, l'attachement est stabilisé et l'inhibition par Aurora B est levée.

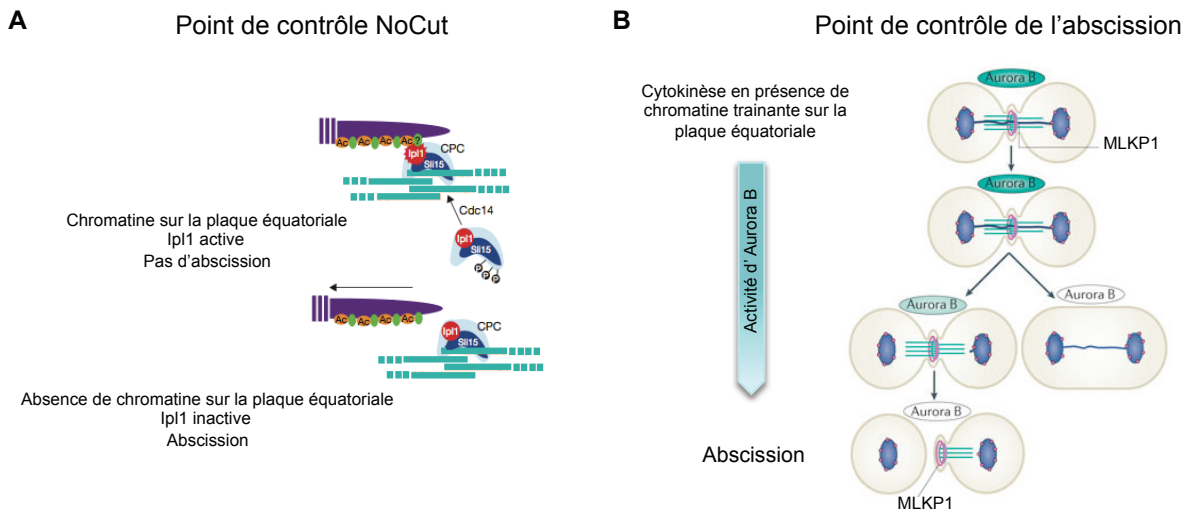


Figure 6. Représentation schématique des points de contrôles de l'achèvement de la cytokinèse.

A. Point de contrôle NoCut chez la levure *S. cerevisiae*. La présence de chromatine trainante sur la plaque équatoriale est détectée par Ipl1 via l'acétylation de la chromatine. D'après (Mendoza et al. 2009). **B.** Point de contrôle de l'abscission chez les vertébrés. Si l'activité de Aurora B est trop rapidement diminuée, il n'y aura pas d'abscission mais la sortie de mitose a quand même lieu, on obtient ainsi une cellule binucléée. D'après (C.-T. Chen, Hehnlly, et Doxsey 2012).

3.2 Le point de contrôle « NoCut »

Chez *S. cerevisiae*, Norden et al. ont mis en évidence l'existence d'un point de surveillance qu'ils ont nommé le « NoCut », contrôlant l'achèvement de la cytokinèse. La présence de chromatine trainante au niveau de la zone médiane du fuseau en fin d'anaphase retarde la cytokinèse afin de prévenir toutes cassures de chromosomes (Norden et al. 2006). Le « NoCut » permet de retarder la cytokinèse mais n'induit pas l'arrêt du cycle. Les protéines impliquées dans le « NoCut » sont la protéine kinase Ipl1/Aurora B et les ARP (anilin-related proteins) Boi1 et Boi2 (Norden et al. 2006; Mendoza et al. 2009). Les data suggèrent que la protéine Ahc1, une sous unité du complexe ADA, acétyle la chromatine présente au niveau de la plaque équatoriale du fuseau. Cette acétylation sert de signal à Ipl1 pour détecter la présence de chromatine trainante en anaphase. La présence de chromatine trainante active Ipl1 et l'activation de Ipl1 est requise à l'export de Boi1 et Boi2 du noyau vers le sillon de clivage pour inhiber la complétion de l'abscission (Figure 6A).

Au contraire chez la levure *S. pombe*, la cytokinèse semble s'opérer indépendamment de la présence d'un défaut au niveau de la plaque équatoriale du fuseau mitotique. Ainsi le phénotype « Cut », où les chromosomes non ségrégués sont coupés à la suite de la cytokinèse, est très souvent observable dans un grand nombre de mutants de condensation de chromosomes. Cependant, dans les cellules HeLa, DT40, et les cellules embryonnaires de *C. elegans*, ce point de contrôle semble conservé (Steigemann et al. 2009; Bembenek et al. 2013). Chez ces dernières, il est appelé point de contrôle de l'abscission, il fait intervenir les protéines kinases Aurora B et Polo et recrute la machinerie ESCRT (endosomal sorting complexes required for transport) et la protéine MLK1 (mitotic kinesin-like 1) pour accomplir l'abscission (Figure 6B); (C.-T. Chen, Hehnly, et Doxsey 2012). Des expériences menées dans les cellules embryonnaires de *C. elegans* suggèrent que le complexe condensine I, présent au niveau du plan de clivage, pourrait prendre part au point de contrôle de l'abscission au travers d'un mécanisme qui reste à élucider (Bembenek et al. 2013). Toutefois, il est à noter que l'existence du

point de contrôle de cytokinèse (NoCut) est sujette à controverses. Notamment, de récents travaux réalisés chez *S. cerevisiae* remettent en question la présence du « NoCut » et le rôle des condensine I dans ce point de contrôle (Cuylen et al. 2013). Cuylen et al. montrent que les cellules accomplissent leur cytokinèse indépendamment d'un problème de migration des chromosomes engendré par une altération du complexe condensine, un défaut de cohésion ou par l'inactivation de la topoisomérase II. Un rôle pour condensine I dans la surveillance de la sortie de mitose reste donc sujet à caution.

II- La chromatine, une structure dynamique

A. Assemblage du nucléosome

La chromatine a été découverte par W. Flemming dans les années 1880. C'est la forme sous laquelle se trouve le matériel génétique dans le noyau des cellules eucaryotes. Elle se compose d'ADN, de protéines histones et non-histones. La stœchiométrie ADN-histone est de 1 :1 en masse.

1. Description du nucléosome

Le nucléosome, de 11 nm de diamètre, est l'unité fondamentale de la chromatine. Il est composé du NCP (nucleosome core particule) et d'une région internucléosomique (ADN de liaison et histone H1) comprenant environ 200 pb d'ADN. Le NCP, dont la structure est très conservée, est composée de 146 pb d'ADN enroulées (1,7 fois) autour d'un octamère d'histones composé de deux copies des histones H3, H4, H2A et H2B.

Le nucléosome se divise en 4 dimères d'histones : 2 dimères H3-H4 qui forment le tétramère (H3-H4)₂ auxquels viennent s'associer 2 dimères H2A-H2B via des interactions entre les histones H2B et H4 (Figure 7A) (K Luger et al. 1997). Les histones H3, H4, H2A et H2B sont des protéines d'environ 15 kDa, très basiques et hautement conservées au cours de l'évolution. Elles sont dotées d'un domaine globulaire central caractérisé par la présence d'un motif HFD (histone fold domain) (Arents et al. 1991) qui permet la dimérisation avec les protéines possédant un HFD. Ce domaine central est

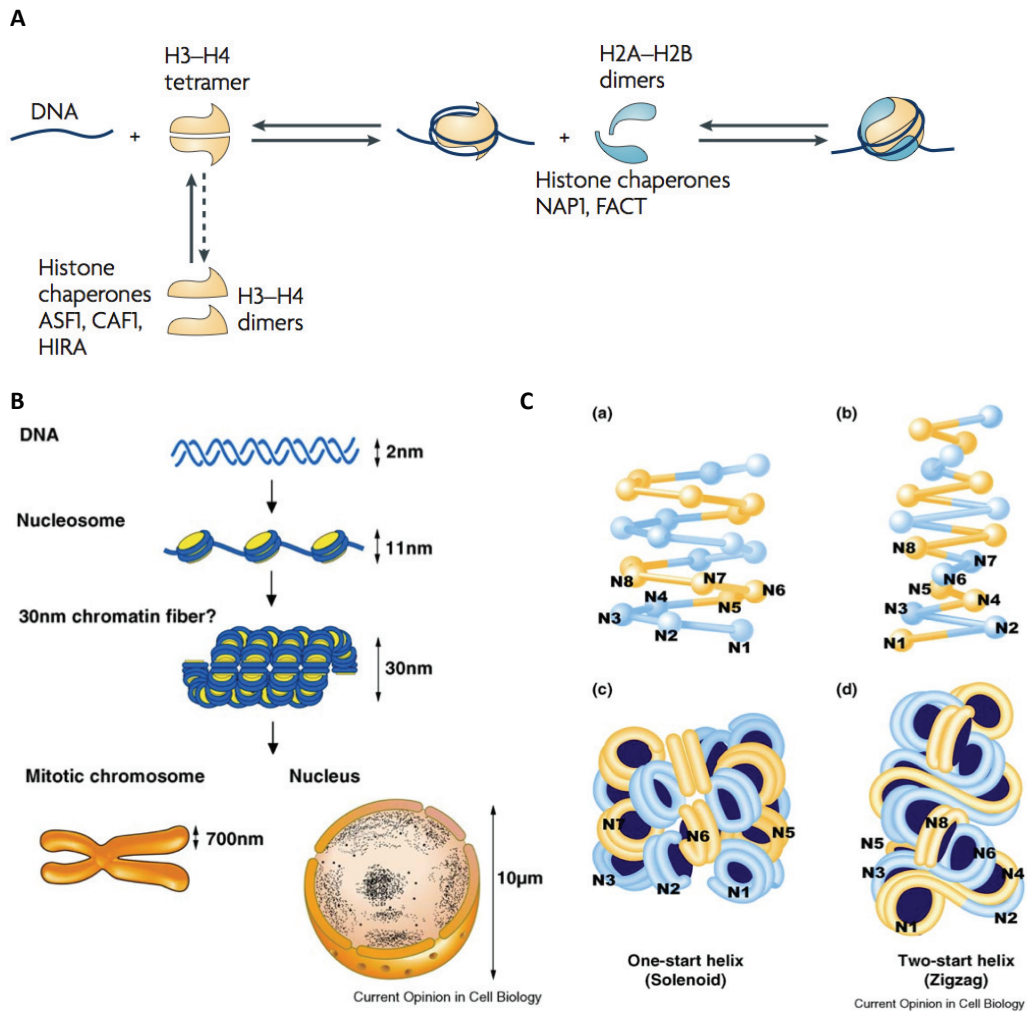


Figure 7. Organisation de la chromatine.

A. L'association du nucléosome nécessite la présence de protéines chaperonnes. L'ADN s'enroule autour du tétramère (H3-H4)₂. Puis deux dimères H2A-H2B s'associent à la nucléoprotéine pour former le nucléosome. D'après (Probst, Dunleavy, et Almouzni 2009). **B.** Les différents états de compaction de la chromatine. D'après (Maeshima, Hihara, et Eltsov 2010). **C.** Les deux modèles proposés pour la conformation de la fibre de 30 nm. D'après (Maeshima, Hihara, et Eltsov 2010).

flanqué d'une queue N-terminale de 15-45 résidus et C-terminale beaucoup plus courte. L'octamère d'histones dans un nucléosome est composé en moyenne de 220 résidus chargés positivement (lysine et arginine) et 74 résidus chargés négativement (acide aspartique et acide glutamique).

Une 5^e histone est accolée au NCP : l'histone H1, également appelée l'histone de liaison. Les histones de classe H1 sont basiques et possèdent un domaine central globulaire très conservé et des extrémités N-terminale et C-terminale très variables. Le NCP associé à l'histone H1 est appelé chromatosome. L'histone H1 s'associe à 40-70 pb d'ADN dit de liaison constituant ainsi la région internucléosomique. Elle se localise au niveau de l'ADN entrant et sortant du NCP. Elle induit le rapprochement des ADN entrant et sortant du NPC, limitant leur mouvement et scellant ainsi le complexe nucléoprotéique (Over et Michaels 2014).

Il est à noter que les histones de levures sont divergentes de celle des mammifères (Baxevanis et Landsman 1998). En effet chez *S. pombe*, la queue N-terminale des histones du NPC est moins riche en résidus lysine, engendrant moins de charges positives et l'histone de liaison au niveau des régions internucléosomiques est absente. Les régions internucléosomiques, d'une longueur de 4 à 5 pb, sont beaucoup plus courtes que chez les autres eucaryotes (Moyle-Heyrman et al. 2013). Quant à la levure *S. cerevisiae*, il existe une histone de liaison de type H1, appelée Hho1 et dite « non classique », qui joue un rôle similaire à l'histone H1 dans la compaction et la structure de la chromatine (Georgieva et al. 2012).

2. Assemblage de novo

Au cours de la réplication, les nucléosomes sont dissociés transitoirement de la chromatine au passage de la fourche de réplication et puis aussitôt réassemblés. D'une part, les histones parentales sont recyclées et transférées sur l'ADN répliqué. D'autre part, des histones nouvellement synthétisées seront incorporées à la chromatine pour reformer des nucléosomes. L'assemblage des nucléosomes requièrent des protéines chaperonnes (Figure 7A) ; (Polo et Almouzni 2006). Avant d'être associée à l'ADN, l'histone H3, ou ses variants, sous forme hétérodimérique avec l'histone H4, est associée aux histones chaperonnes CAF-1 (chromatin factor-1) ou HIRA (histone regulator A) et ASF1 (anti-silencing function-1). De même, l'organisation des nucléosomes est

transitoirement changée lors du passage de l'ARN polymérase II (ARN Pol II) au cours de la transcription ou lors de réponse aux dommages à l'ADN.

ASF1 est nécessaire à la formation de l'hétérotétramère (H3-H4)₂. Lors de la réplication, ASF1 intervient dans le recyclage du tétramère (H3-H4)₂ présent dans la fibre de chromatine, via son recrutement par l'hélicase MCM2-7 (Gurard-Levin, Quivy, et Almouzni 2014) et dans l'assemblage *de novo* d'un tétramère (H3-H4)₂. Cet assemblage peut être réalisé entièrement à partir d'histones néosynthétisées, ou en y incorporant des histones parentales (Polo et Almouzni 2006). Toujours pendant la réplication, le complexe CAF-1, recruté par PCNA (proliferating cell nuclear antigen), est spécialisé dans le dépôt du tétramère variant (H3.1-H4)₂ sur l'ADN. Le complexe HIRA, lui, dépose le tétramère (H3.3-H4)₂ au niveau des régions du génome généralement pauvres en nucléosomes, comme certains élément régulateurs de gènes (Gurard-Levin, Quivy, et Almouzni 2014). Au niveau des télomères, le tétramère (H3.3-H4)₂ est déposé via les protéines chaperonnes DAXX. Quant aux centromères, c'est le tétramère (CENP-A-H4)₂ qui s'associe à l'ADN via les protéines HJURP (Holliday junction recognition protein) (Gurard-Levin, Quivy, et Almouzni 2014). Les activités HIRA, DAXX et HJURP sont indépendantes de la réplication.

Les dimères H2A-H2B, associés aux protéines chaperonnes Nap1 (nucleosome assembly protein1) ou FACT (facilitates chromatine transcription), sont rapidement associés aux tétramères (H3-H4)₂ pour former les nucléosomes. La dissociation de ce dimère est nécessaire pour le passage de l'ARN pol II au cours de la transcription. Ainsi au cours du cycle cellulaire, la dissociation et l'association des nucléosomes sont des processus très dynamiques afin de pouvoir répondre aux besoins cellulaires.

B. Les niveaux d'organisation de la chromatine

1. Fibre de 11 nm

La structure primaire de la chromatine, parfois nommée structure en collier de perle, observée *in vitro* par cristallographie aux rayons X, constitue le premier degré de compaction de l'ADN (Olins et Olins 2003). Elle est composée de nucléosomes séparés par les régions internucléosomiques formant une fibre de 11 nm de diamètre. L'ADN nu, de 2 nm de diamètre, est chargé négativement et interagit avec l'octamère d'histones

chargées positivement. Sur 200 pb, l'ADN comporte 400 résidus phosphates négativement chargés. Pour chaque nucléosome, environ la moitié de la chromatine est neutralisée par ces résidus phosphates, et l'autre moitié est neutralisée par la présence d'autres facteurs, comme les histones H1, les cations et autres protéines chargées positivement. L'organisation de ce nucléofilament varie en fonction de la séquence d'ADN, des modifications post-traductionnelles des histones, et des protéines non-histones présentes sur la chromatine. Ces conditions définissent les structures secondaire (fibre de 30 nm de diamètre) et tertiaire (degré de compaction supérieur) de la chromatine (Figure 7B)

L'histone H1 est nécessaire pour la compaction du nucléo-filament en fibre de 30 nm de diamètre (Thoma, Koller, et Klug 1979). Sous microscope électronique, les fibres de 30 nm apparaissent comme des structures hélicoïdales composées de 6 nucléosomes par tour. Sous cette forme, l'ADN est compacté environ 40 fois par rapport à sa dimension linéaire. Concernant la conformation de la fibre de 30 nm, deux modèles s'affrontent : le modèle solénoïde et le modèle en zigzag (Figure 7C) (Maeshima, Hihara, et Eltsov 2010). Dans le modèle solénoïde, le nucléo-filament s'enroule et forme une structure hélicoïdale, en surface de laquelle les nucléosomes consécutifs sont adjacents. Dans le modèle zigzag, le nucléofilament adopte une forme de zigzag où les nucléosomes consécutifs sont alternativement d'un côté et de l'autre de la fibre, formant ainsi une double hélice. Les fibres de 30 nm seraient ensuite repliées en structure d'ordre supérieur pour aboutir au chromosome métaphasique, qui constituerait le plus haut niveau de compaction de l'ADN (Figure 7B).

Il semblerait que les deux conformations - solénoïde ou zigzag - dépendent des conditions utilisées *in vitro*. De plus, la présence de la fibre de 30 nm *in vivo* a été remise en cause (Karolin Luger, Dechassa, et Tremethick 2012). L'ensemble des analyses réalisées par cryo-EM (cryo- electron microscopy) suggère que la fibre de 30 nm n'est pas présente *in vivo* et que le chromosome mitotique serait constitué d'un réseau dense fibres de 11 nm (polymer melt) (Maeshima et al. 2014). Les résultats obtenus par la technique de SAXS (small-angle X-ray scattering) suggérant la présence de fibres de 30 nm *in vivo* se sont avérés être des artefacts causés par l'association des ribosomes à la chromatine (Maeshima et al. 2014). De même, les analyses réalisées par USAXS (ultra-

small-angle X-ray scattering) sont en accord avec l'hypothèse d'une structure de chromatine interphasique et mitotique fondée sur l'enchevêtrement de fibres de 11 nm, et non de 30 nm (Maeshima et al. 2014).

2. Euchromatine et hétérochromatine

En interphase, la chromatine nucléaire s'organiserait sous forme de domaines compacts constitués de fibres de 11 nm repliées de façon irrégulière, et ces domaines seraient interconnectés par des zones de chromatine moins compacte (Maeshima et al. 2014). Deux grands types de chromatine ont été définis selon leurs propriétés structurales et fonctionnelles. L'hétérochromatine correspond à une forme compacte de la chromatine, qui ne décondense pas en fin de mitose. L'euchromatine, au contraire correspond à une forme de la chromatine qui décondense et se déploie en interphase. Les régions d'hétérochromatine se situent au niveau des centromères et des télomères, et au niveau de régions pauvres en gènes et de régions constituées de séquences répétées. L'euchromatine, quant à elle, se situe au niveau des bras de chromosomes et au niveau de régions riches en gènes (séquences uniques). Ainsi les régions d'hétérochromatine sont très condensées et peu sensibles aux recombinaisons méiotiques, en contraste avec l'euchromatine. Cette dernière est permissive à la transcription. Hétérochromatine et euchromatine sont associées à des modifications post-traductionnelles des histones qui leur sont propres (cf ChapI-IC1 « modification de la chromatine »).

La chromatine est une structure nucléoprotéique complexe qui contient l'information génétique et contrôle les fonctions cruciales du génome. C'est une structure dynamique qui se réorganise en permanence pendant la réplication, la transcription, la réparation, la recombinaison et la condensation des chromosomes. Elle possède des fonctions essentielles comme compacter l'ADN, organiser les territoires chromosomiques, séparer les fonctions chromosomiques (télomères, centromères), et moduler l'accessibilité de l'ADN.

3. Structure du chromosome mitotique

L'assemblage du chromosome métaphasique, classiquement représenté sous la forme d'un X, demeure une énigme pour la biologie. Paulson et Laemmli ont extrait les histones associées de chromosomes mitotiques isolés en plaçant ces derniers dans des solutions de forte force ionique ou riche en polyanions. Ils ont observé un squelette protéique en forme X duquel émanait un halo de boucles d'ADN (Paulson and Laemmli, 1977). De ces observations, et d'autres, est né le modèle selon lequel le chromosome mitotique serait constitué d'un squelette protéique sur lequel viendraient s'ancrer des boucles de chromatine (Marsden et Laemmli 1979), via des séquences SAR (scaffold attachment regions), riches en A-T (Saitoh et Laemmli 1994). Dans ce modèle, les boucles radiales de 50 à 100 kb seraient formées à partir des fibres de 30 nm guidées par des protéines non histones interagissant spécifiquement avec l'ADN. Un second modèle propose, au contraire, un repliement hiérarchique des fibres de chromatine où la formation du chromosome ne dépend pas d'un squelette protéique mais résulte plutôt d'enroulements hélicoïdaux et de repliements successifs (Belmont et Bruce 1994).

Des expériences de micromanipulation des chromosomes suggèrent la présence d'enroulements et de repliements de chromatine (Kireeva et al. 2004). De plus, des mesures d'élasticité de chromosomes mitotiques isolés et maintenus entre deux micropipettes indiquent qu'un chromosome mitotique peut être étiré jusqu'à plusieurs fois sa taille normale et ensuite revenir à ses dimensions initiales (Poirier et al. 2000). En revanche, une pulvérisation de nucléase sur ces chromosomes mitotiques isolés entraîne une perte de l'élasticité (Poirier et Marko 2002; Belmont 2002). Ces observations s'accordent mal avec l'hypothèse d'un squelette chromosomique rigide. Pourtant, les protéines topoisomérase II et les complexes condensines, essentiels à la condensation mitotique des chromosomes, sont enrichis le long de l'axe longitudinal de chaque chromatide sœur, rappelant la structure du squelette chromosomique en X (Maeshima et al. 2014). D'ailleurs, Topo II et Smc2 (sous unité des condensines) ont été identifiées comme des constituants majeurs du squelette. Les expériences réalisées sur des cellules humaines montrent que la distribution longitudinale des condensines et de topoisomérase II s'établit en prophase et que les condensines sont également associées à la chromatine sur, et en périphérie, du chromosome (Maeshima et Laemmli 2003; Kireeva et al. 2004). Une hypothèse serait que les complexes condensines maintiennent

la fibre de 11 nm au centre de l'axe longitudinal du chromosome mitotique en créant des boucles radiales de chromatine (Maeshima et al. 2014). A ce jour, aucun des deux modèles (squelette protéique ou repliement hiérarchique) ne semble prévaloir.

Quel que soit le mécanisme de formation du chromosome métaphasique, les données à disposition indiquent qu'il s'agit d'un processus déterministe et donc vraisemblablement ordonné. Ce caractère déterministe est révélé par l'existence de bandes chromosomiques reproductibles, qui impliquent une organisation longitudinale mais également radiale des fibres de chromatine (Strukov et al. 2011). Les analyses réalisées à partir d'AFM (atomic force microscopy), EM après digestion enzymatique à la tripsine, ou par coloration par le Giemsa mettent en évidence l'existence de bandes sur les chromosomes mitotiques. Il en existe 4 types : les bandes C (centromere), Q (quinacrine), G (giemsa) et R (reverse) (Ushiki et al. 2002). Les bandes G/Q sont riches en AT alors que les bandes R (ou G négative) sont riches en CG. Les boucles de chromatine seraient de petite taille et auraient une organisation hélicoïdale au niveau des bandes G, tandis qu'elles seraient de plus grande taille avec une organisation plus linéaire au niveau des bandes R (Saitoh and Laemmli, 1994). L'organisation de ces bandes chromosomique est hautement hiérarchisée et reproductible d'une cellule à l'autre, suggérant l'existence d'un « plan » organisateur des chromosomes mitotiques (cf. Chap1- IIC5 « organisation spatiale du génome dans le noyau»). Ce plan pourrait être défini en partie par la composition de l'ADN et/ou les modifications des histones.

C. Dynamique de la chromatine

La chromatine est une structure dynamique, qui évolue au cours du cycle cellulaire. Les principaux mécanismes qui assurent le dynamisme de la chromatine sont : l'action de complexes de remodelage permettant la mobilisation des nucléosomes, les modifications post-traductionnelles des histones, la méthylation de l'ADN au niveau des îlots CpG (marques de répression transcriptionnelle ou hétérochromatine), la production d'ARN non-codants, l'incorporation de variants d'histones au sein du NCP et l'organisation spatiale (3D) de la chromatine dans le noyau.

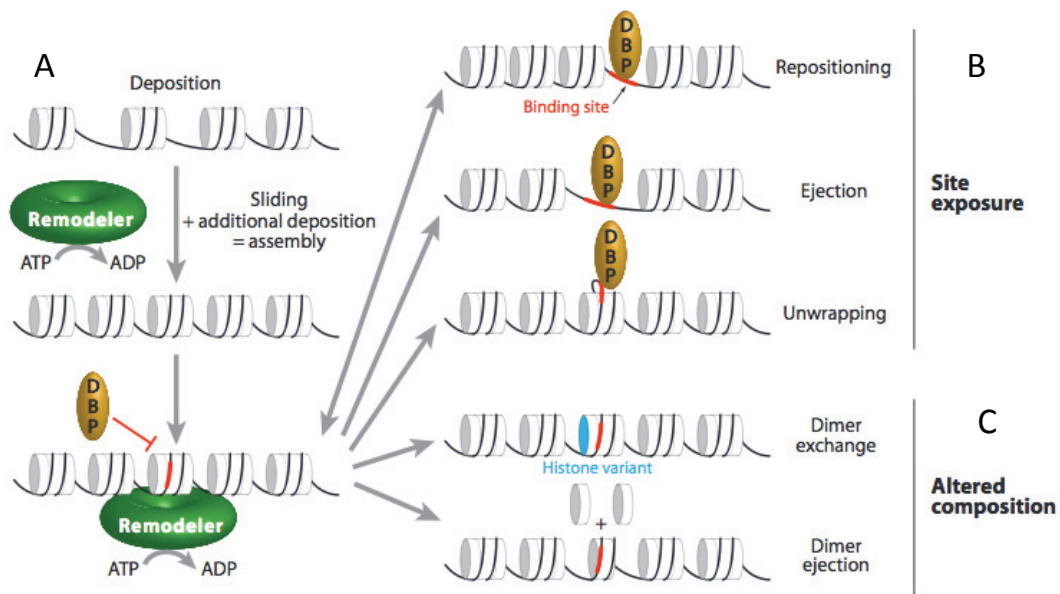


Figure 8. Le remodelage de la chromatine.

A. Les complexes de remodelage de la chromatine (vert) sont capables de modifier la chromatine en mobilisant les nucléosomes **B.** Initialement inaccessible par la présence d'un nucléosome, les sites cibles (rouge) deviennent accessibles aux facteurs DBP (DNA binding protein) par glissement d'un nucléosome (repositionnement), éviction totale du nucléosome (éjection) ou un décollement partiel de l'ADN en éliminant localement des interactions histone-ADN. **C.** Les sites devenus accessibles (rouges) peuvent également aboutir à une altération de la composition du nucléosome par le remplacement de dimères parentaux par des dimères variants (bleu) ou encore par l'éviction partielle d'un nucléosome (éjection de dimère) (Clapier et Cairns 2009).

1. Le remodelage de la chromatine

Les complexes remodeleurs modulent la structure de la chromatine en déplaçant, modifiant ou éliminant les nucléosomes. Les enzymes de remodelage se répartissent en quatre familles que sont SWI/SNF (*switching defective/sucrose non fermenting*), ISWI (*imitation switch*), CHD (*chromodomain, helicase, DNA binding*) et INO80 (*inositol requiring 80*). Les protéines de ces familles partagent cinq propriétés. Elles présentent une forte affinité pour les nucléosomes et sont capables de reconnaître les modifications des histones. Elles possèdent un domaine ATPase, et utilisent l'hydrolyse de l'ATP comme source d'énergie pour altérer les interactions ADN-histone (Figure 8). Cette activité est régulée par un domaine et/ou une sous unité spécifique permettant l'association du complexe remodeleur à la chromatine. Enfin, elles présentent un domaine et/ou une sous unité capable d'interagir avec d'autres facteurs de chromatine ou de transcription (Clapier et Cairns 2009).

Prenons l'exemple du complexe SWI/SNF chez les levures *S. cerevisiae* et *S. pombe*. Il en existe deux classes : le complexe Swi/Snf et le complexe RSC (remodel the structure of chromatin), dont les sous unités ATPase sont respectivement Snf2/Snf21 et Sth1/Snf22. Ces complexes sont capables de transférer un nucléosome sur un ADN exogène en *trans*, et de déplacer un nucléosome le long du brin d'ADN. Ces complexes partagent deux sous unités Arp (actin related protein): Arp7 et Arp9 chez *S. cerevisiae* (Cairns et al. 1998) et Arp42 et Arp9 chez *S. pombe* (Szerlong, Saha, et Cairns 2003). Les protéines ARP semblent interagir avec les nucléosomes en fonction de modifications post traductionnelles des histones (M. Chen et Shen 2007). Ces complexes participent à la régulation de l'expression génique et sont recrutés sur la chromatine de manière gène-spécifique par des protéines régulatrices (Monahan et al. 2008). Ils interagissent avec la chromatine via les sous unité Snf2 (Swi/Snf) et Rsc8 (RSC) au niveau des trois premiers nucléosomes à partir du TSS (transcription start site) et au niveau des sites NFR (nucleosome free region) (Yen et al. 2012). Le complexe Swi/snf est connu pour réguler l'activation de transcription (Sudarsanam et al. 2000) et le complexe RSC pour réguler les ARN polymérase II et III (Parnell, Huff, et Cairns 2008).

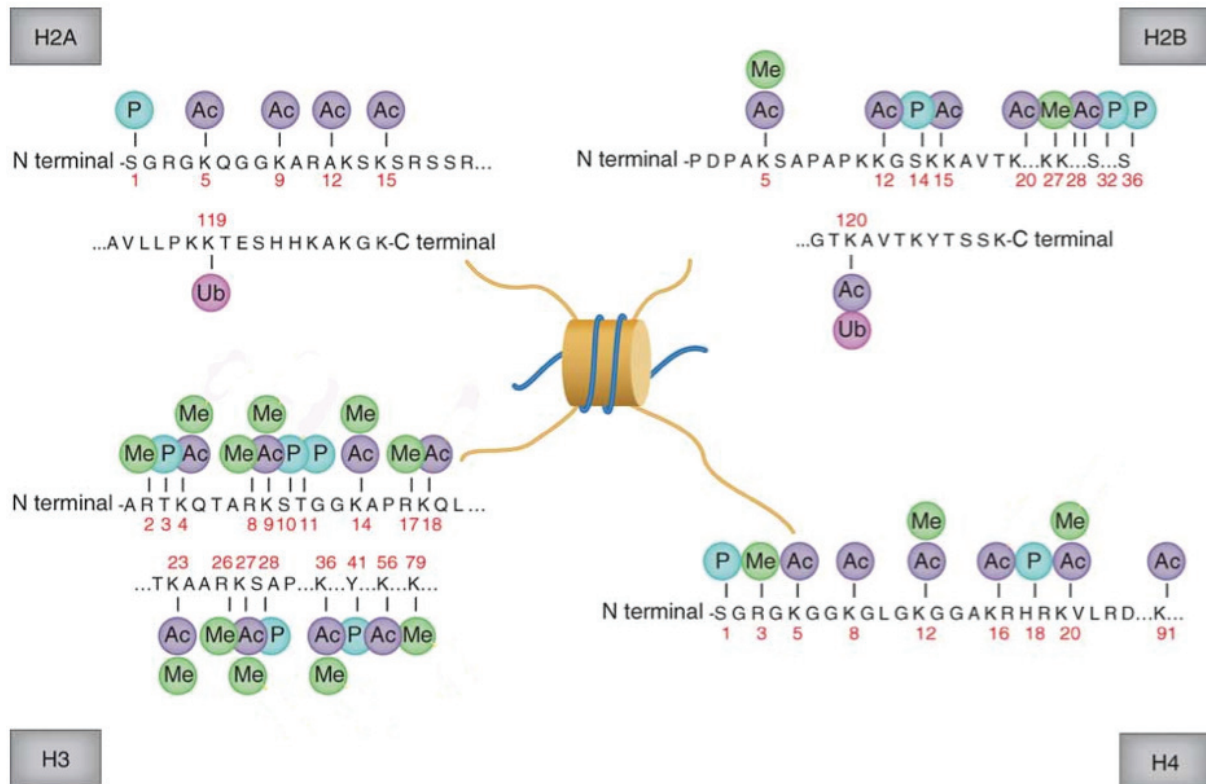


Figure 9. Les principales modifications post traductionnelles des histones du NPC.

P, phosphorylation ; Ac, acétylation ; Me, méthylation ; Ub, ubiquitination. D'après (Rodríguez-Paredes et Esteller 2011).

2. Les modifications post traductionnelles des histones

Les histones sont cibles de modifications post traductionnelles réversibles, essentiellement au niveau de la queue N terminale (Figure 9). En fonction du type de modification, l'organisation de la chromatine va être changée localement en altérant les interactions histone-ADN, ou en recrutant spécifiquement des protéines capables de lier les résidus d'histone modifiés. Les principales modifications post-traductionnelles d'histones sont :

- *l'acétylation des résidus lysine :*

Cette modification est en général associée à une activation de la transcription, avec notamment l'acétylation des lysine K9, K14 et K18 de l'histone H3 (Grunstein 1997). L'acétylation est réalisée par les HAT (histone acetyl transferase) et est supprimée par les HDAC (histone deacetylase) qui reconnaissent les lysines acétylées via leur bromodomaine. Le bromodomaine est un domaine capable de reconnaître et se fixer sur les lysines acétylées (Zeng et Zhou 2002). L'acétylation neutralise la charge positive des résidus lysines affaiblissant l'interaction entre l'histone et l'ADN, ce qui rend l'ADN plus accessible à la machinerie transcriptionnelle. L'acétylation des histones est un processus très dynamique facilitant la mobilisation et la restauration des nucléosomes au cours de la transcription (Zentner et Henikoff 2013).

- *la méthylation des lysines et les arginines :*

L'effet de la méthylation sur la chromatine dépend du nombre de groupe méthyles déposés sur le résidu et varie en fonction du résidu méthylé (Lachner et Jenuwein 2002). Par exemple, les méthylations de H3K4, H3K36 et H3K79 sont des marques associées à une transcription active alors qu'au contraire les méthylations H3K9, H3K27 et H4K20 sont plutôt associées à la répression de transcription. La di ou triméthylation de H3K9 est une marque typique de l'hétérochromatine.

- *la phosphorylation des résidus sérines et thréonines :*
Les phosphorylations de H3S10 et H3S28 par la protéine kinase Aurora B sont associées à la condensation des chromosomes au début de la mitose (Hans et Dimitrov 2001). Le rôle de la phosphorylation des histones est d'induire des charges répulsives entre les histones et l'ADN, rendant l'ADN accessible à d'autres facteurs.
- *l'ubiquitination des résidus lysines :*
L'ubiquitination de l'histone H2K119 réprime la transcription des gènes en inhibant l'élongation de la transcription par l'ARN Pol II (Zhou et al. 2008). Par contre, l'ubiquitination de H2BK123 est impliquée dans l'élongation de la transcription et le réassemblage de la chromatine après le passage de la fourche de réplication (Zentner et Henikoff 2013).
- *l'ADP-ribosylation des histones :*
Cette modification est impliquée à la fois dans la réplication, la transcription et la réparation de l'ADN (D D'Amours et al. 1999). Elle est retrouvée sur l'ensemble des histones du NPC et l'histone de liaison sous forme de mono- ou poly-ADP-ribosylation. L'ADP-ribosylation apporte une charge négative aux résidus modifiés suggérant que ces modifications créent des charges répulsives entre les histones et l'ADN, facilitant l'accessibilité de l'ADN (Zentner et Henikoff 2013)
- *la β -N-acetylglucosamination (OGlcNAc) des résidus sérine thréonine :*
On retrouve cette modification sur les histones H2A, H2B et H4. La OGlcNAc globale des histones aurait un effet répresseur sur la transcription alors que, certaines marques comme O-GlcNAcylation de H2BS112 en H2BK120ub1 seraient associées à une transcription active (Zentner et Henikoff 2013). Les mécanismes par lesquels la OGlcNAc serait impliquée dans la régulation transcriptionnelle restent obscurs.

Les nucléosomes sont des structures dynamiques régulées par les diverses modifications post-traductionnelles des histones (Zentner et Henikoff 2013). Le système est hautement combinatoire (à une modification donnée ne correspond une réaction

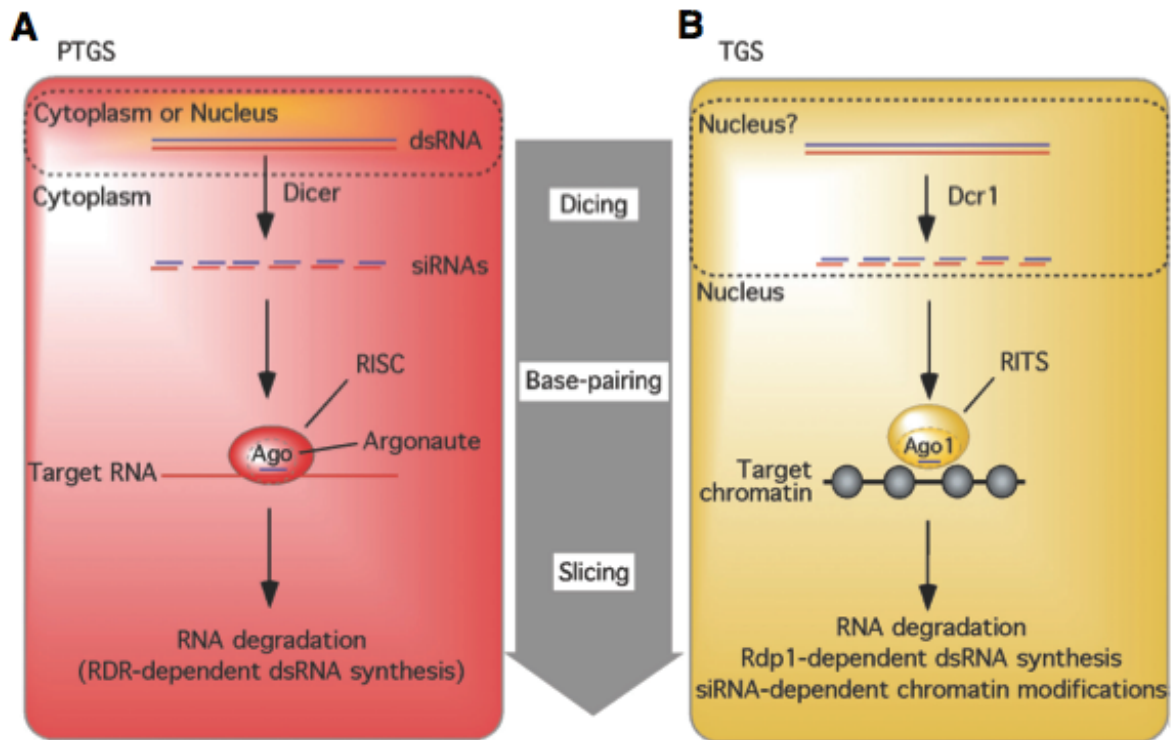


Figure 10. Schéma représentatif des systèmes ARN interférence.

Ces systèmes font intervenir les protéines Dicer et Argonaute. **A.** Système PTGS (Post Transcriptional Gene Silencing). L'ARNc s'hybride à l'ARN complémentaire dans le noyau ou le cytoplasme. Cet ARN double brin (dsRNA pour double strand RNA) est reconnu par Dicer (Dcr 1) qui le clive en petit ARN double brin (siRNA pour small interfering RNA), activant le complexe RISC (RNA Induced Silencing Complex). Les ARNm ciblés par RISC seront alors dégradés par l'activité RNase du complexe RISC (Argonaute). **B.** Système TGS (Transcriptional Gene Silencing). Les siRNA, ici sont reconnus par le complexe RITS (RNA Induced Transcriptional Silencing), et le guide vers la chromatine en s'hybridant aux ARN naissants, où RITS induit des modifications post-traductionnelles des histones répressives. D'après (Verdel et al. 2009).

biologique donnée). C'est la combinaison de plusieurs modifications dans un contexte précis et dans une phase du cycle cellulaire qui va déclencher la réaction biologique correspondante.

3. Les variants d'histones

A chaque histone, à l'exception de l'histone H4, un variant d'histone lui correspond. Par définition, un variant d'histone a la capacité de remplacer l'histone conventionnelle correspondante dans un nucléosome. Les variants d'histones sont susceptibles d'induire des changements de structure du nucléosome et ainsi de modifier les interactions entre l'ADN et les protéines. De plus, ces variants sont également la cible de modifications post-traductionnelles (Strukov et al. 2011). A titre d'exemple, on trouve les variants H2A.Z, H2A.X, H2B.FWT, et les variants H3.1, H3.3 ou CENP-A.

4. Les ARN non codants

Les ARNnc (non codant) sont de petits ARN ne codant pas de protéine mais impliqués, par exemple, dans la structure de la chromatine et/ou la régulation de l'expression génique. Un exemple bien décrit est le système ARNi. C'est le système par lequel les ARNnc s'hybrident aux séquences complémentaires et y cible des machineries de répression de l'expression génique. Il y a deux types de répression induites par les petits ARNnc : au niveau de la transcriptionnel et au niveau post-transcriptionnel. On les retrouve sous les acronymes TGS pour Transcriptional Gene Silencing et PTGS pour Post Transcriptional Gene Silencing (Figure 10)(Lejeune et Allshire 2011; Moazed 2009; Verdell et al. 2009). Une différence majeure est que, dans le système PTGS, l'hybridation d'un petit ARN sur l'ARN complémentaire entraîne sa dégradation dans le cytoplasme, tandis que le TGS agit dans le noyau, en association avec des modifications répressives de la chromatine qui peuvent être maintenues à travers les divisions cellulaires (Verdell et al. 2009). Dans le cas du TGS, les petits ARN guideraient la machinerie de modification de la chromatine en s'hybridant aux ARN naissants. Récemment, des ARNnc de longueur plus importante (>200 nucléotides), appelés ARNlnc (long non coding), ont été

impliqués dans la régulation transcriptionnelle et post transcriptionnelle (Mercer et Mattick 2013).

5. Organisation spatiale du génome dans le noyau

La chromatine interphasique se compacte pour s'organiser en boucle de 150-200 kpb en formant des fibres d'un diamètre allant jusqu'à 250 nm (contre 850 nm dans le chromosome métaphasique). Chaque chromosome peut occuper un territoire différent, comme cela a été montré chez le poulet. Il a également été montré que les chromosomes riches en gènes sont localisés préférentiellement vers le centre du noyau, et ceux pauvres en gènes à la périphérie. De plus, au sein d'un chromosome, les gènes exprimés sont préférentiellement situés en périphérie du domaine formé par le chromosome dans le volume nucléaire (Bickmore et van Steensel 2013). Parmi les rôles interphasiques des complexes condensines, condensine II aurait un rôle dans l'organisation territoriale des chromosomes (Tatsuya Hirano 2012a). Ce point sera développé dans le chapitre I-IVA sur « les rôles de condensine ».

III- La condensation mitotique

A. Rôles et dynamique de la condensation mitotique

La condensation mitotique des chromosomes est le processus par lequel la chromatine interphasique se condense en début de mitose pour former les chromosomes mitotiques, hautement structurés. Il s'agit d'un préalable essentiel à la ségrégation correcte des chromosomes en anaphase, et, par conséquent, à la stabilité du génome nucléaire au travers des divisions cellulaires. Ce processus est réversible et coordonné avec la progression mitotique. La condensation mitotique débute en prophase et se termine en télophase.

Parmi les prérequis nécessaires au déroulement correcte de la mitose, on trouve la cohésion des chromatides sœurs réalisée par les complexes cohésine, la résolution des chromatides sœurs réalisées par la topoisomérase II, et le super-enroulement et raccourcissement des chromosomes interphasiques pour former les chromosomes mitotiques réalisés par les complexes condensines (Jonathan Baxter et Aragón 2012;

Losada 2007; Tatsuya Hirano 2012a; Piazza, Haering, et Rutkowska 2013).

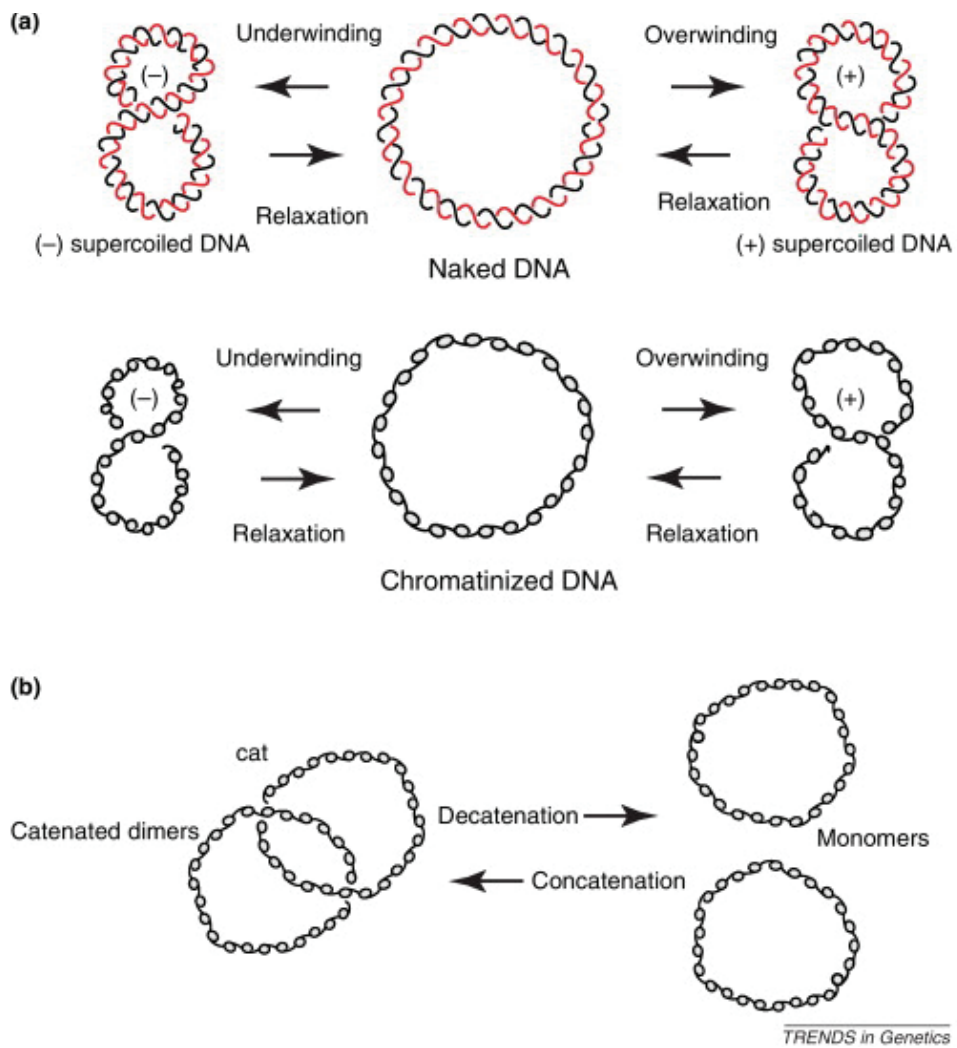


Figure 11. Représentation schématique des structures topologiques transitoires de l'ADN ou de la chromatine.

A. Topo II induit le relâchement des molécules d'ADN ou de chromatine super-enroulées positivement ou négativement. **B.** Topo II est capable de caténer ou décaténer deux molécules d'ADN (Jonathan Baxter et Aragón 2012).

B. Facteurs de condensation

1. Topoisomérase II

La topoisomérase II a été identifiée comme une protéine associée au squelette protéique (scaffold) des chromosomes (Lewis et Laemmli 1982). C'est une enzyme capable de catalyser le passage d'un ADN double brin au travers d'un second, grâce à son activité de coupure-ligation, ATP-dépendante (Porter et Farr 2004). L'activité de coupure-ligation n'est pas orientée. La topoisomérase II peut indifféremment caténer ou décaténer deux molécules d'ADN proches (Figure 11B). Chez les vertébrés, il existe deux isoformes de la topoisomérase II, α et β . La topoisomérase II α est impliquée dans les événements mitotiques, tandis que la topoisomérase II β intervient plutôt dans les événements interphasiques (réparation de l'ADN, transcription). Dans ce manuscrit, le terme de topo II fait référence à la topoisomérase II α . La localisation sur la chromatine de cette dernière est dynamique durant la mitose (Baxter et Aragón 2012).

L'activité de topo II est nécessaire à l'individualisation des chromosomes mitotiques, en éliminant les caténats entre les différents chromosomes. Topo II est également requise pour éliminer les caténats entre les chromatides sœurs (on parle de résolution des chromatides sœurs) afin qu'elles se séparent efficacement lors du déclenchement de l'anaphase. Une déficience de topo II empêche la séparation efficace des chromosomes en anaphase, créant des ponts chromatiniens (Baxter et Aragón 2012). Les centromères frères gagnent les pôles opposés du fuseau, mais les bras de chromosome restent emmêlés et s'étirent sur la longueur du fuseau mitotique. En utilisant un système rapporteur permettant de mesurer la condensation longitudinale des chromosomes, le groupe de C.Hearing a montré que topo II est requise à la condensation mitotique des chromosomes chez *S. pombe* (Petrova et al. 2013). Le rôle de topo II dans la condensation pourrait être d'éliminer les caténats qui s'opposent à la compaction de la chromatine. Il a été montré que topo II collabore avec les complexes condensines (Baxter et Aragón 2012). Cependant, alors condensine I promeut le super-enroulement positif de l'ADN, topo II permettrait le relâchement de ce super-enroulement (Figure 11A). La condensation mitotique résulterait donc d'un équilibre entre l'activité de super-enroulement de condensine I et de celle de relâchement de topo II (Baxter et Aragón 2012).

2. Les condensines

Des acteurs clefs acteur clef de la condensation mitotique sont les complexes condensine I et II (Tatsuya Hirano 2012b). Condensine I a été identifiée il y a plus de 15 ans comme une enzyme chromosomique nécessaire à la condensation des chromosomes chez le Xénope (T Hirano, Kobayashi, et Hirano 1997). Condensine II a été découverte en 2003 (Ono et al. 2004; Yeong et al. 2003). Les deux complexes condensine existent chez la plupart des eucaryotes. Cependant, seule condensine I (communément appelé condensine) est présente chez les levures *S. pombe* et *S. cerevisiae* (T Hirano, Kobayashi, et Hirano 1997; Sutani et al. 1999), et conservée chez tous les eucaryotes. Chez la plupart sinon tous les eucaryotes, la déficience des complexes condensine I ou II altère profondément la condensation mitotique des chromosomes et entraîne la formation de ponts chromatiniens en anaphase (Jonathan Baxter et Aragón 2012).

La présence ou l'absence de condensine II n'est pas corrélée à la taille ou la complexité du génome. Condensine II est présente chez des organismes à petits génomes telle que l'algue rouge *Cyanidioschyzon merolae* (génome: 16 Mb) ou absente chez des organismes à plus grands génomes tel le protozoaire cilié *Tetrahymena thermophila* (génome : 180 Mb) (Tatsuya Hirano 2012b). Ces data suggèrent que condensine I et condensine II seraient apparues en même temps et que certaines espèces, comme *S. cerevisiae* et *S. pombe*, auraient perdu condensine II au cours de l'évolution, pour une raison encore inconnue. Il existe un complexe SMC « condensin-like » chez la plupart des procaryotes (Graumann et Knust 2009). L'origine des condensines est donc antérieure à celle des histones, ce qui suggère que ces complexes condensines ont un rôle ancestral dans l'organisation du génome. Les diverses fonctions de ces complexes seront détaillées dans la partie IV intitulée « les complexes condensines ».

3. RCA (Regulator of Chromosome Architecture)

Dans les cellules de poulet DT40, la déplétion de SMC2, qui est une sous unité commune aux deux complexes condensine, par l'utilisation d'un gène répressible par l'adjonction de doxycycline dans le milieu de culture, n'entraîne pas de défaut majeur de condensation des chromosomes en métaphase. La condensation est retardée en prophase, mais les chromosomes acquièrent un certain niveau de condensation en

métaphase (Vagnarelli et al. 2006). En revanche, ces derniers forment systématiquement des ponts chromatiniens en anaphase (Vagnarelli et al. 2006). Sur la base de ces observations, il a été proposé qu'une activité distincte des condensines, appelée RCA, pour regulator of chromosome architecture, contribue à la compaction de la chromatine de la prophase jusqu'en métaphase, et que le rôle premier des condensines seraient de maintenir l'architecture chromosomique en anaphase. L'identité de RCA est à ce jour inconnue. Il a été proposé que RCA pourrait être conservée chez la levure *S. pombe* (H.-S. Kim et al. 2009).

Alternativement, il est concevable que la déplétion de SMC2 ne soit pas totale dans les cellules DT40, et qu'une faible quantité de condensine effective suffise pour assurer la condensation des chromosomes jusqu'en anaphase. En accord avec cette idée, des études protéomiques de la composition globale des chromosomes ont montré que 5% de la quantité normale de protéine SMC2 sauvage persistent dans les chromosomes de poulet en condition de déplétion de SMC2 (Ohta et al. 2010). L'existence ou non de RCA reste donc un sujet débattu.

4. La protéine Kif4

Comme topo II et les condensines, la protéine kinésine Kif4 est abondante au niveau de l'axe longitudinale des chromosomes (K. Samejima et al. 2012). Kif4 est un moteur moléculaire des extrémités positives des microtubules. Cette protéine s'associe au chromosome en mitose et cette association est liée à celle de condensine. La délétion de Kif4 entraîne une diminution de l'association de condensine I à la chromatine plus importante que celle de condensine II et les chromosomes mitotiques ont une apparence boursouflée. Les données de protéomiques sur chromosomes isolés montrent une diminution significative des protéines des sous unités régulatrices de condensine I et des sous unité Smc2 et Smc4, communes aux condensines I et II, associées aux chromosomes (K. Samejima et al. 2012). L'ensemble de ces data suggèrent que Kif4 est impliquée dans l'association des condensines à la chromatine. Dans les cellules humaines, Kif4 a un rôle dans la condensation mitotique des chromosomes, leur alignement sur la plaque équatoriale, l'organisation du fuseau mitotique et la cytokinèse (Vagnarelli 2012). Il a été suggéré que les activités des

condensines et de Kif4 dans la condensation mitotique des chromosomes seraient équivalentes (K. Samejima et al. 2012).

5. Autres facteurs de condensation

5.1 Les polyamines

Les polyamines sont des composés organiques composés de groupement amines. Ces sont des molécules chargés positivement, impliquées dans la régulation de la croissance cellulaire (Wallace, Fraser, et Hughes 2003). Les polyamines sont capables de s'associer aux molécules d'ADN, et sont connues pour induire des torsions dans l'ADN. Ces torsions semblent associées à la condensation mitotique de l'ADN (Pastré et al. 2006). La concentration des polyamines est hautement régulée au travers du cycle cellulaire, avec une concentration maximale en phase G1 suivi d'une décroissance en phase S puis d'une remontée en phase G2 juste avant le début de la mitose (Wallace, Fraser, et Hughes 2003). Les polyamines telles que les spermines et les spermidines semblent affecter la conformation de la chromatine *in vivo*. Un traitement des cellules avec du sodium azide libère les polyamines liées à l'ATP et augmente la concentration des polyamines associées à l'ADN, ce qui engendre une hypercompaction de l'ADN (Visvanathan et al. 2013). Les polyamines pourraient donc contribuer à la condensation mitotique des chromosomes.

5.2 La protéine Trf 4

Chez la levure *S. cerevisiae*, la condensation mitotique de l'ADN ribosomique requiert les protéines Trf 4 et la topoisomérase I (Castaño et al. 1996). Le double mutant *top1 trf4-ts* présente des défauts de condensation où à la fois l'établissement et le maintien de la condensation des ADNr sont altérés. La protéine Trf4 interagit physiquement avec la sous unité Smc2. Trf4 est la polyA polymérase du complexe TRAMP (Trf4/Air2/Mtr4p Polyadenylation) (Houseley, LaCava, et Tollervey 2006), bien connu pour son rôle de cofacteur de l'exosome dans la maturation ou dégradation des ARN. Bien que cette

interaction entre Smc2 et Trf4 n'est pas été confirmée chez d'autres organismes, elle suggère la possibilité d'un lien entre condensine I et le complexe TRAMP.

5.3 Les protéines pRB

Les protéines du rétinoblastome (pRB), sont très fréquemment mutées dans les rétinoblastomes et ont été décrites comme les premiers suppresseurs de tumeur. Chez la drosophile, la protéine RBF 1, de la famille pRB, est nécessaire à l'association de la sous unité CAP-D3 de condensine II à la chromatine (Longworth et al. 2008). RBF 1 interagit directement avec CAP-D3 et cette interaction semble être conservée chez la souris, où une défaillance de condensation mitotique a été liée à un risque élevé de cancérogenèse (Coschi et al. 2010). En revanche pRB n'est pas requise à l'association de condensine I à la chromatine. Son rôle serait donc spécifique à condensine II (Manning, Longworth, et Dyson 2010).

5.4 La protéine Wpl 1

La protéine Wpl 1 est connue pour réguler la cohésion des chromatides sœurs (Tedeschi et al. 2013). Elle intervient dans l'établissement de la cohésion en phase S par le complexe cohésine et son maintien jusqu'en prophase (cf Chap I- IVB2 « La cohésine »). La protéine Wpl1 jouerait également un rôle dans la condensation des chromosomes (Tedeschi et al. 2013, Lopez-Serra et al. 2013). Chez *S. cerevisiae*, la délétion de Wpl1 entraîne une condensation accrue des chromosomes mitotiques mais également interphasiques(Lopez-Serra et al. 2013). L'implication de Wpl1 dans la condensation semble être conservée chez les mammifères où la délétion de Wapl1 altère l'architecture du chromosomes mitotique (Tedeschi et al. 2013). Cependant, l'absence de Wapl1 n'a pas d'impact notable sur la localisation des condensines (Smc2) (Tedeschi et al. 2013). L'ensemble de ces data suggère que l'interaction entre les complexes cohésine et la chromatine pourrait impacter la condensation des chromosomes.

Tableau1. Les condensines dans les organismes modèles.

Sous unités	Homme	<i>Xenopus</i>	<i>Drosophila</i>	<i>S. pombe</i>	<i>S. cerevisiae</i>	<i>C. elegans</i>
SMC	SMC2/hCAP-E	XCAP-E	DmSMC2	Cut14	Smc2	MIX-1
	SMC4/hCAP-C	XCAP-C	DmSMC4	Cut3	Smc4	SMC4
Non-SMC spécifiques Condensine I	hCAP-D2	XCAP-D2	CG1911	Cnd1	Ycs4	DPY-28
	hCAP-G	XCAP-G	CG17054	Cnd2	Ycs5/Ycg1	CAPG-1
	hCAP-H	XCAP-H	Barren	Cnd3	Brn1	DPY-26
Non-SMC spécifiques Condensine II	hCAP-D3	XCAP-D3	CG311989	-	-	HCP-6
	hCAP-G2	XCAP-G2	-	-	-	CAPG-2
	hCAP-H2	XCAP-H2	CG144685	-	-	KLE-2

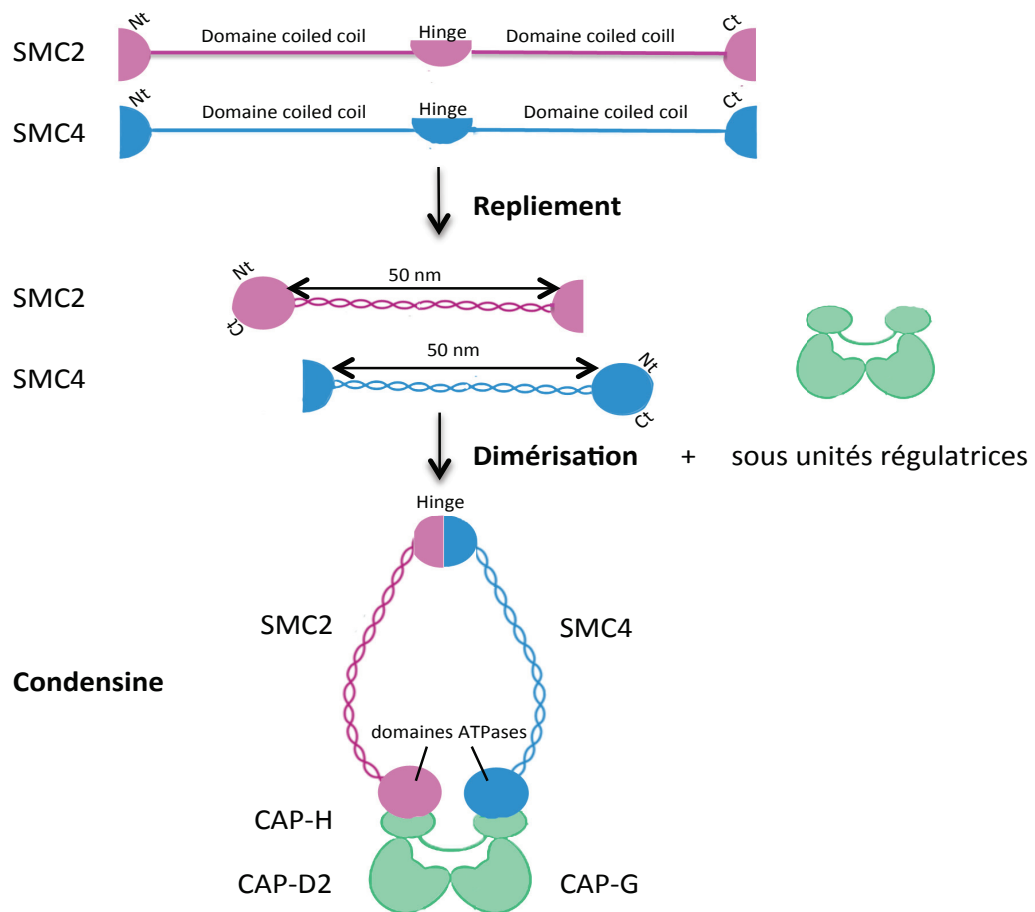


Figure 12. Schéma représentatif de la formation et de la composition du complexe condensine I.

voir le texte pour détail

IV- Les complexes condensine

Les condensines sont des pentamères composés des protéines SMC2 et SMC4 (Structural Maintenance of Chromosome) et de trois sous unités régulatrices CAP (Chromosome Associated Protein). Les complexes condensine I et II partagent les mêmes protéines SMC2 et SMC4, mais diffèrent par la nature de leur sous-unités régulatrices CAP (Tableau 1). SMC2 et SMC4 sont deux ATPases qui forment un dimère qui sédimente à 8S, retrouvé parfois sous le nom de condensine 8S. Les protéines SMC possèdent deux domaines « *coiled coil* », séparés par une région charnière (Hinge), qui s'associent par interaction intramoléculaire formant ainsi des bâtonnets de 50 nm de long. Les sous unités régulatrices existent au sein d'un sous complexe 11S, coiffant les domaines ATPases situées en vis-à-vis aux extrémités de l'hétérodimère SMC2-SMC4 (Figure 12). L'association de ces sous complexes 8S et 11S constitue le complexe condensine 13S, qui correspond à condensine I (Kimura et Hirano 2000).

Parmi les trois sous unités régulatrices, l'une appartient à la superfamille des kleisines et les deux autres possèdent des domaines de répétitions HEAT (Huntingtin Elongation Factor 3-protein phosphatase 2A-TOR1). La kleisine se lie directement aux têtes ATPases de SMC2 et SMC4 via ses extrémités N-terminale et C-terminale, respectivement (Onn et al. 2007), créant ainsi une structure en forme d'anneau, et recrute les deux protéines à motifs HEAT.

A. Les activités de condensine

1. Activité de super- enroulement et de décaténation de l'ADN double brin

Des expériences *in vitro* ont montré que Condensine possède une activité de super-enroulement positif de l'ADN, stimulée par la phosphorylation de ses sous unités régulatrices par le complexe cycline-B/CDK1 (Kimura et al. 1998). Cette activité requiert les 5 sous unités de condensine et l'hydrolyse de l'ATP (Kimura et Hirano 2000). Plus récemment, il a été montré chez *S. cerevisiae* que la phosphorylation de condensine I réalisée par la kinase Polo augmente son activité de super-enroulement (St-Pierre et al. 2009). La phosphorylation a lieu en anaphase, quand l'activité CDK1 chute, et est

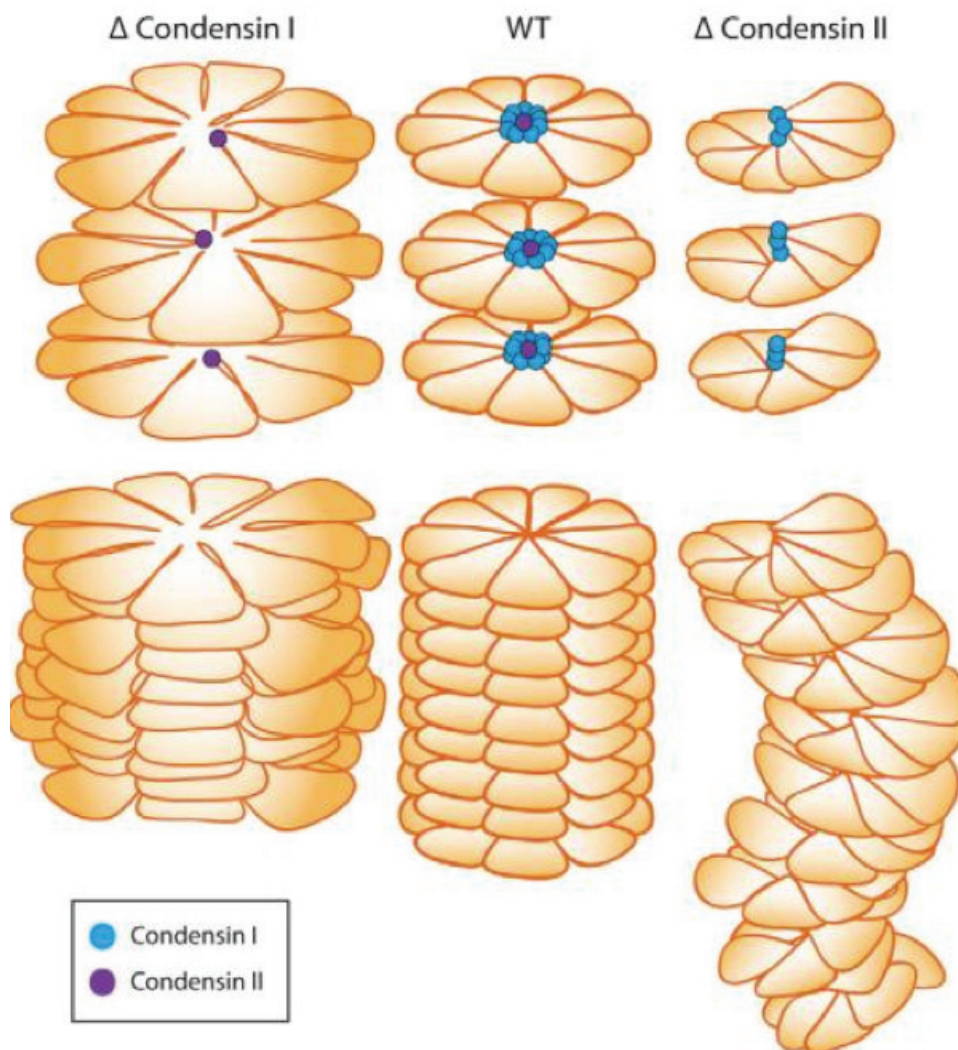


Figure 13 Représentation schématique des contributions de condensine I et condensine II à l'architecture du chromosome métaphasique.

En l'absence de condensine I, seule la compaction longitudinale est réalisée par condensine II. En l'absence de condensine II, condensine I assure une compaction latérale (Green et al. 2012).

nécessaire à la condensation des chromosomes, suggérant une relation causale entre l'activité de super-enroulement de condensine I et la condensation des chromosomes.

Chez la levure *S. cerevisiae*, la sous unité SMC2 est requise pour l'activité de super-enroulement positif de condensine (J. Baxter et al. 2011). De plus le super-enroulement positif de l'ADN semble être un facteur clef pour promouvoir l'activité de décaténation des chromatides sœurs par topo II (J. Baxter et al. 2011). Condensine orienterait l'activité de topo II vers la décaténation. La moindre décaténation des chromosomes et/ou des chromatides sœurs en l'absence de condensine fonctionnelle pourrait contribuer à la formation de ponts chromatiniens en anaphase.

2. Assemblage du chromosome métaphasique

Chez les vertébrés, condensine I et II participent à la formation des chromosomes mitotiques (Ono et al. 2003; Hirota et al. 2004). Mais leurs contributions respectives diffèrent. Les quantités relatives de condensine I et II dans la cellule ont un impact sur la morphologie des chromosomes. Dans les extraits d'œuf de Xénope, les chromosomes ont une apparence longue et fine et le ratio de condensine I vis-à-vis de condensine II est de 5 :1. Dans les cellules HeLa, les chromosomes sont courts et larges, et le ratio condensine I/II est de 1 :1 (Ono et al. 2003). Des analyses protéomiques sur des chromosomes mitotiques extraits de cellules DT40 de poulet ont montré un ratio de condensine I/II égal à 10 :1 (Ohta et al. 2010). Dans ces mêmes cellules DT40, la perte de CAP-H (condensine I) ou de CAP-D3 (condensine II) modifie différemment la structure chromosomique (Green et al. 2012). Des expériences d'immuno-déplétion quantitative des condensines I ou II dans le système acellulaire d'œuf de Xénope ont clairement démontré l'implication différente de condensine I et II sur la structure du chromosome métaphasique (Shintomi et Hirano 2011). Lorsque le ratio condensine I/II est déplacé de 5 :1 à 1 :0 (ratio des cellules HeLa), les chromosomes passent d'une structure longue et fine à courte et large. Sur la base de ces observations, il a été proposé que condensine II aurait un rôle dans la compaction longitudinale des chromosomes et condensine I plutôt dans la compaction latérale (Figure 13) (Shintomi et Hirano 2011).

3. Maintien de l'architecture chromosomique en anaphase

Les complexes condensines sont nécessaires à la ségrégation des chromosomes durant l'anaphase (Ono et al. 2003; Hirota et al. 2004). Chez tous les eucaryotes, une altération des complexes condensines engendre des défauts de ségrégation des chromosomes en anaphase sous la forme des ponts chromatiniens persistants ou de chromosomes entiers ou cassés non attachés aux microtubules kinétochoriens et trainant sur le fuseau mitotique (Hudson, Marshall, et Earnshaw 2009; Piazza, Haering, et Rutkowska 2013). Cependant, nous ne savons pas si ces phénotypes résultent d'un défaut d'établissement de la condensation ou de maintien de l'état condensé en anaphase. Plusieurs expériences ont montré la nécessité des condensines dans le maintien de l'état condensé et organisé des chromosomes en anaphase. Les expériences *in vitro* d'Hirano en 1997 montrent que l'adjonction d'anticorps anti condensine I sur des chromosomes déjà formés entraîne une perte de condensation, indiquant que les condensines sont requises au maintien de l'architecture du chromosome mitotique (T Hirano, Kobayashi, et Hirano 1997). Chez *S. pombe*, l'inactivation de condensine, spécifiquement en anaphase, par l'emploi de mutants thermosensibles, induit des ponts chromatiniens (Nakazawa et al. 2011). La délétion de H2A.Z, qui entraîne une dissociation de condensine de la chromatine prématurée en anaphase, a pour conséquence la formation de ponts chromatiniens en anaphase (H.-S. Kim et al. 2009). Chez *S. cerevisiae*, condensine I stimulerait le super enroulement des chromosomes en début d'anaphase et cette activité semble faciliter l'élimination des cohésines chromosomiques résiduelles pour la complète séparation des chromatides sœurs (Renshaw et al. 2010). Ces observations indiquent que l'activité de condensine est requise au maintien de la condensation en anaphase. En accord avec cette idée, il a été montré chez les cellules de mammifères que la compaction maximale des chromosomes mitotiques est atteinte en anaphase, de façon dépendante de l'activité de la kinase Aurora (Mora-Bermúdez, Gerlich, et Ellenberg 2007). Chez *S. cerevisiae*, condensine I est suractivée en début d'anaphase par la kinase polo. (St-Pierre et al. 2009). L'ensemble de ces observations indique que les condensines sont requises à la formation des chromosomes mitotiques en début de mitose et à la préservation de leur intégrité structurale tout au long de la mitose.

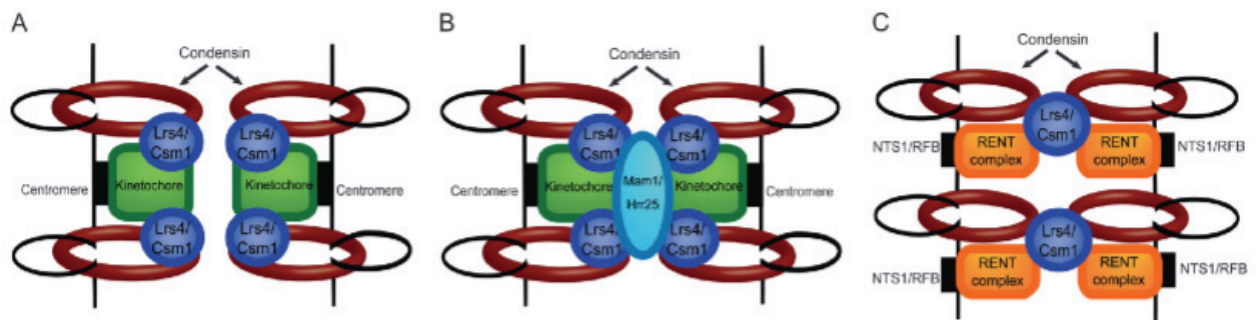


Figure 14. Représentation schématique du rôle de condensine I en méiose au niveau des kinétochores et des ADNr.

A. Condensine s'associe à la chromatine et interagit avec Csm1-Lrs4 au niveau des kinétochores. **B.** Cette association permet le recrutement de la protéine Mam1, qui permet la cohésion des deux kinétochores afin qu'ils migrent vers le même pôle du fuseau mitotique lors de l'anaphase I. **C.** Condensine est également nécessaire au maintien des ADNr. Le complexe RENT (regulator of nucleolar silencing and telophase exit) recrute le complexe Csm1-Lrs4, qui s'associe aux condensines en les recrutant au niveau des ADNr. D'après (Brito, Yu, et Amon 2010).

4. Autres fonctions

4.1 Rôle méiotique

La méiose est composée de deux divisions cellulaires appelées méiose I et méiose II. La méiose I correspond à la division de la cellule mère en 2 cellules diploïdes alors la méiose II correspond à la division de 2 cellules filles en 4 cellules filles haploïdes. Les chromosomes condensent en méiose, et les complexes condensines sont impliqués dans la condensation méiotique des chromosomes (J. Lee 2013). Cependant les mécanismes par lesquels les complexes condensines prennent part à ce processus sont bien moins connus que pour la condensation mitotique.

Dans l'ovocyte de souris en métaphase I, condensine II se localise le long de l'axe longitudinal des chromosomes bivalents alors que condensine I est enrichie seulement au niveau centromérique. Condensine I apparaît le long des bras de chromosome après l'anaphase I, lorsque les cohésines se dissocient de la chromatine. Ces résultats suggèrent que condensine I a un rôle dans le fonctionnement des centromères en méiose I, lorsque les kinétochores frères s'attachent au fuseau de façon monopolaire (et non bipolaire comme en mitose ou en méiose II). Chez *S. cerevisiae*, le complexe monopoline composé de Mam1-Csm1-Lrs4 interagit avec la caséine kinase CKII et CDK1 pour assurer la co-orientation des kinétochores frères vers le même pôle du fuseau (Corbett et al. 2010). Condensine I est impliquée dans ce processus en recrutant la protéine Mam1 au niveau des kinétochores (Brito, Yu, et Amon 2010). Ces data suggèrent que condensine I collabore avec le complexe monopoline pour la co-orientation des chromatides sœurs en méiose I (Figure 14). De plus, Csm1-Lrs4 interagirait avec condensine I au niveau des ADNr afin de prévenir les recombinaisons entre des répétitions d'ADNr mal appariées (Figure 14). (Brito, Yu, et Amon 2010).

Les travaux sur les ovocytes de souris suggèrent également un rôle pour les condensines dans l'attachement co-orienté des kinétochores en méiose I (J. Lee et al. 2011). D'autres fonctions méiotiques ont été attribuées aux condensines. Chez *S. cerevisiae*, condensine I régulerait l'assemblage du complexe synaptonémal, l'appariement des chromosomes homologues, et la réparation des cassures double brin dans l'ADN (Yu et Koshland 2003). Chez *C. elegans*, condensine I régulerait le nombre et la distribution des *cross-overs* (Mets et Meyer 2009). L'ensemble de ces fonctions traduit vraisemblablement

l'importance des condensines dans l'organisation du génome, indépendamment de la nature de la division cellulaire.

4.2 Rôle interphasique

Les condensines sont des enzymes polyvalentes qui ont été impliquées dans de nombreuses fonctions outre la condensation mitotique des chromosomes : la réparation des dommages dans l'ADN, la régulation de l'expression génique et l'organisation tridimensionnelle du génome dans le noyau en interphase. Chez *S. pombe*, Cnd2, une sous unité régulatrice de condensine I, a été impliquée dans la réponse à un dommage à l'ADN par NER (nucleotide excision repair) (Aono et al. 2002). Une mutation ponctuelle au niveau du domaine charnière de Cut14/SMC2 engendre un défaut de ségrégation des chromosomes et une hypersensibilité aux dommages à l'ADN (Akai et al. 2011). *In vitro*, l'hétérodimère Cut14-Cut3 (SMC2-SMC4) est capable de ré-hybrider les molécules d'ADN simple brin quand RPA (replication protein A) y est associée. Il a été proposé que l'une des fonctions primaires de condensine serait de dissocier les protéines et/ou les ARN associés à la chromatine afin de rendre le site endommagé accessible aux facteurs de réparation de l'ADN (Akai et al. 2011). Chez les mammifères, condensine I participe à la réparation des dommages à l'ADN en s'associant en interphase à la protéine PARP-1 (polyADP-ribose polymerase 1), détectrice de cassure ADN (Heale et al. 2006). La participation de condensine I à la réparation des cassures dans l'ADN semble donc évolutivement conservée.

Des études ont montré que condensine I est nécessaire à la répression transcriptionnelle des gènes du mating type chez *S. cerevisiae* et des gènes homéotiques chez *D. melanogaster* (A. J. Wood, Severson, et Meyer 2010). Condensine II est également requise à la répression de l'expression génique dans les larves de drosophile (Longworth et al. 2012). Chez les mammifères, condensine II a été impliqué dans la répression des gènes de prolifération dans les lymphocytes T quiescents (Rawlings et al. 2011). Condensine II assurerait ce rôle répresseur en compactant la chromatine, empêchant ainsi l'accès à l'ADN aux facteurs de transcription. Cependant, une étude réalisée sur les cellules humaines suggère que la chromatine des chromosomes mitotiques reste accessible aux facteurs de transcription (D. Chen et al. 2005). De plus,

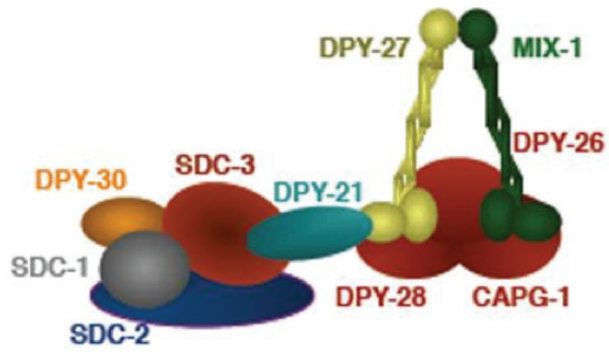


Figure 15 Le complexe Condensine I^{DC}.

Association des deux sous complexes du mécanisme dosage dépendant : Condensine I^{DC} et les sous complexes SDC1-2-3-DPY-21-30. D'après (Csankovszki, Petty, et Collette 2009).

une étude *in vivo* et *in silico* suggère que la dynamique des nucléosomes est la même dans des chromosomes interphasiques et mitotiques, et que cette dynamique facilite l'accessibilité de la chromatine aux facteurs liant l'ADN (Hihara et al. 2012). L'ensemble de ces résultats suggère que la répression transcriptionnelle par les complexes condensines est conservée au cours de l'évolution, et que le mécanisme sous-jacent n'est pas fondé sur la seule condensation de la chromatine réduisant l'accessibilité des facteurs de transcriptions à l'ADN.

Chez *S. pombe*, condensine participe à l'organisation spatiale du génome par le regroupement des retro-transposons LTRs (long terminal repeat) et des gènes transcrits par l'ARN polymérase III (ARN pol III) en foci dans le volume nucléaire (A. Tanaka et al. 2012; Iwasaki et al. 2010). Chez *S. cerevisiae*, condensine est nécessaire à l'organisation de l'ADN nucléolaire et participe au regroupement des 274 gènes codant les ARNt dispersés sur les 16 chromosomes en quelques foci dans le noyau (Haeusler et al. 2008).. L'ensemble de ces data indique que condensine est impliquée dans l'organisation tridimensionnelle du génome.

Les condensines sont donc des enzymes polyvalentes, impliquées dans de multiples processus nucléaires en mitose et en interphase. Comment les condensines assurent l'ensemble de ces fonctions apparemment distinctes demeure mal compris.

4.3 Cas de *C. elegans* : Condensine I^{DC} (dosage compensation)

Chez *C. elegans* est présente une troisième forme de condensine appelée DCC (dosage compensation complex) ou condensine I^{DC}. Cette dernière est impliquée dans la compensation de dosage génique, diffère de condensine I par une de ses sous-unités et n'a pas de fonction mitotique connue. Dans le complexe condensine I^{DC}, la sous-unité DPY-27 remplace SMC4 (Figure 15A) (Csankovszki, Petty, et Collette 2009). Condensine I^{DC} s'associe aux chromosomes X des vers hermaphrodites (XX) (Figure 15B) et réduit le niveau d'expression des gènes de moitié (pour atteindre le même niveau que chez les mâles XO). Condensine I^{DC} est également trouvée associée au niveau de gènes autosomaux, tels que le gène *her-1* impliqué dans le développement d'un ver mâle, les gènes codant les histones, et au niveau des ADNr et des ADNt. Des études biochimiques montrent que condensine I^{DC} est associée à un autre complexe, nommé SDC-1-2-3,

Tableau 2. Les complexes SMC

	SMC	Complexe	Fonction
Procarvote	BsSMC ou MukB	Condensin like de <i>B. subtilis</i> et <i>E. coli</i> , respectivement	Organisation et transmission du chromosome bactérien
	SMC1 SMC3	Cohésine	Cohésion des chromatides sœurs
Eucaryote	SMC2 SMC4	Condensine I et II	Condensation des chromosomes
	SMC5 SMC6	Complexe SMC5-SMC6	Réplication et recombinaison

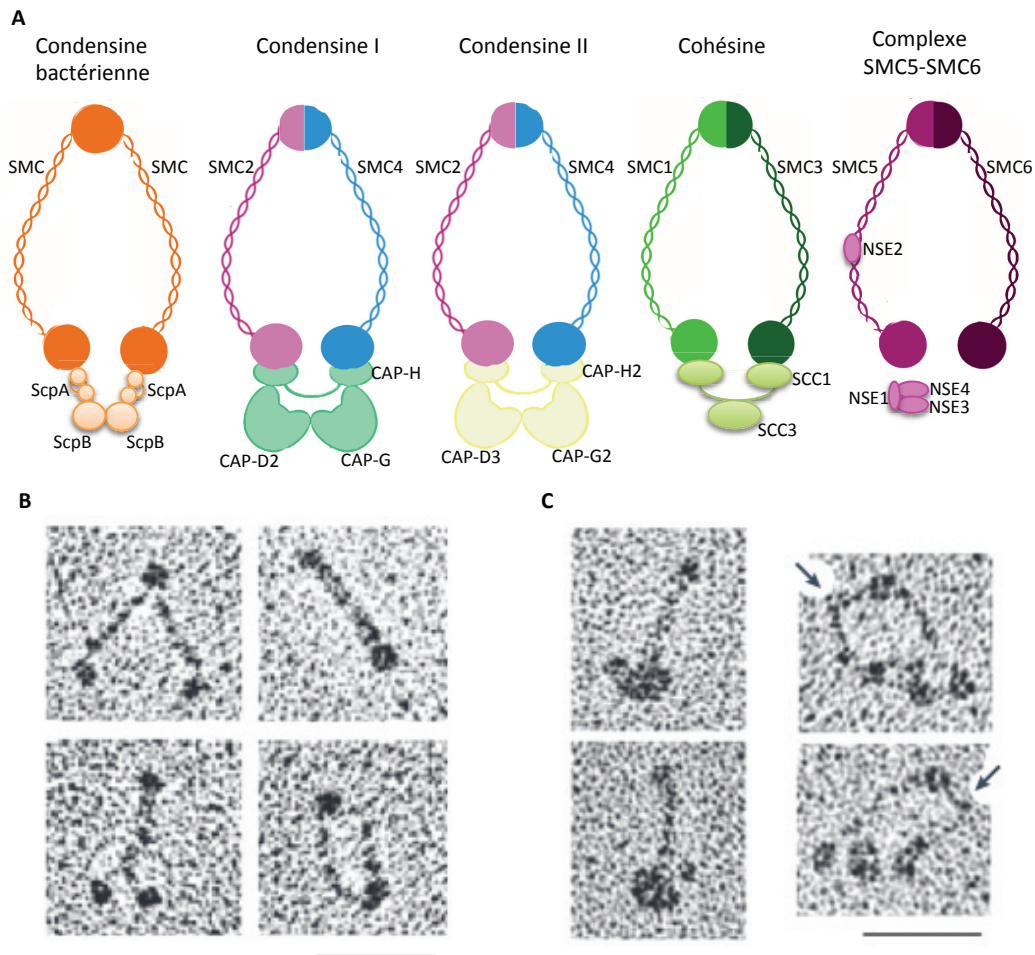


Figure 16 Les complexes SMC.

A. Les différents complexes SMC. **B.** Micrographies électroniques d'homodimères BsSMC montrant diverses conformations. **C.** Micrographies électroniques de condensine I (panneau de gauche) et cohésine (panneau de droite). Les flèches montrent la conformation particulière de la sous unité SMC3. Extrait et modifié à partir de T Hirano, 2006.

nécessaire à la répression du gène autosomal *her-1*, et deux autres protéines : DPY-21, liant les deux complexes condensine I^{DC} et SDC-1-2-3, et DPY30, l'homologue de COMPASS associé au sous complexe SDC-1-2-3 (Figure 16A) (Csankovszki, Petty, et Collette 2009).

L'occupation des gènes du chromosome X par l'ARN pol II est augmentée chez des mutants de Condensine I^{DC} (Pferdehirt, Kruesi, et Meyer 2011) et l'association de condensine I^{DC} au chromosome X est corrélée à une restructuration du chromosome dans les vers hermaphrodites. La restructuration du chromosome X par condensine I^{DC} pourrait donc jouer un rôle dans la compensation de dosage génique par répression transcriptionnelle.

B. Fonctionnement moléculaire des complexes SMC

Initialement décrites par Strunnikov *et al.* en 1993, les protéines de la famille SMC (Structural Maintenance of chromosomes) sont des ATPases chromosomiques essentielles à l'organisation et à la stabilité des chromosomes. Les protéines SMC sont présentes des bactéries jusque chez l'Homme (Tableau 2). *Bacillus subtilis* et *Escherichia coli* possèdent une seule protéine SMC impliquée à l'état d'homodimère dans la formation d'un complexe condensine bactérien (Figure 16). Au contraire, les cellules eucaryotes possèdent six protéines SMC différentes (SMC1 à SMC6), formant trois hétérodimères distincts (Figure 16). SMC2 s'associe avec SMC4 au sein des condensines I et II, SMC1 et SMC3 forment le corps du complexe cohésine qui assure la cohésion des chromatides sœurs, et SMC5 et SMC6 participent à un complexe peu caractérisé, impliqué dans la réplication et la recombinaison de l'ADN.

Les protéines SMC partagent une même structure. Les complexes condensines et cohésine ont une organisation similaire, suggérant qu'ils puissent fonctionner selon un même principe ancestral. Ci-dessous je présente la structure des protéines SMC et leurs complexes ainsi que les données disponibles quant à leur fonctionnement moléculaire.

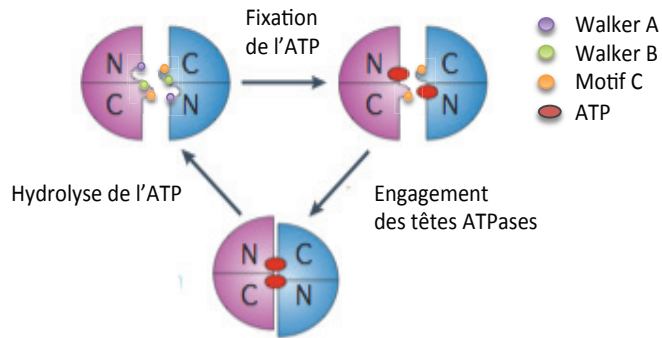


Figure 17. Cycle d'association et dissociation des domaines ATPases des protéines SMC2 et SMC4.

Les extrémités N et C terminales de Smc2 (rose) et Smc4 (bleu) forme un domaine ATPase complet de type ABC. Une molécule d'ATP se fixe au niveau des domaines walker A et B de chacune des têtes ATPases provoquant leur association. L'hydrolyse de l'ATP entraîne la dissociation des têtes ATPases. Extrait et modifié à partir de T Hirano, 2006.

1. Les protéines SMC

Les protéines SMC possèdent deux domaines de fixation de nucléotide, appelés Walker A et Walker B, situés respectivement aux extrémités N- et C-terminales. L'association intramoléculaire des domaines *coiled coil* génère des monomères en forme de bâtonnet avec la région charnière (Hinge) à une extrémité et, à l'autre, un domaine ATPase reconstitué par la juxtaposition des motifs Walker A et B (Figure 17).

L'interaction spécifique de deux protéines SMC par les domaines charnières crée des hétérodimères en forme de V avec les domaines ATPase positionnés en vis-à-vis aux extrémités distales des bras *coiled coil* (Figure 16; (Tatsuya Hirano 2005; Piazza, Haering, et Rutkowska 2013). La fixation d'une molécule d'ATP par chacune des têtes ATPase induit leur association. Les têtes seraient catalytiquement inactives jusqu'à ce qu'elles entrent en contact. Ainsi les protéines SMC se caractérisaient par une capacité à former des anneaux protéiques bipartites instables; l'hydrolyse de l'ATP entraînant leur ouverture par dissociation des têtes ATPases. Ces protéines SMC ne sont jamais trouvées seules, elles sont toujours associées à des protéines régulatrices. Le rôle des protéines régulatrices est de réguler l'association du complexe à la chromatine et son activité (Tatsuya Hirano 2006).

Il est à noter que la protéine Rad50 appartient également à la famille SMC. Rad50 intervient dans la réponse aux dommages à l'ADN au sein d'un complexe constitué de la phosphoestérase Mre11 (meiotic recombination 11:) et de sa sous unité régulatrice Nbs1 (Nijmegen breakage syndrome 1) chez *S. pombe*, dont les homologues sont Mre11 et Xrs2 chez *S. cerevisiae*. Ce complexe, nommé MRN/X (Mre11-Rad50-Nbs1/Xrs2) est présent chez tous les eucaryotes et conservé chez les procaryotes. Les fonctions du complexe MRN/R sont dépendantes de la fixation et de l'hydrolyse de l'ATP au niveau de Rad50. Mre11 possède une activité nucléase et Nbs1 régule l'activité de Rad50-Mre11 et la localisation du complexe dans le noyau (Paull et Deshpande 2014).

2. La cohésine

Le complexe cohésine est vraisemblablement le complexe Smc dont les mécanismes d'association à la chromatine sont les mieux connus à ce jour. Cohésine est composée de

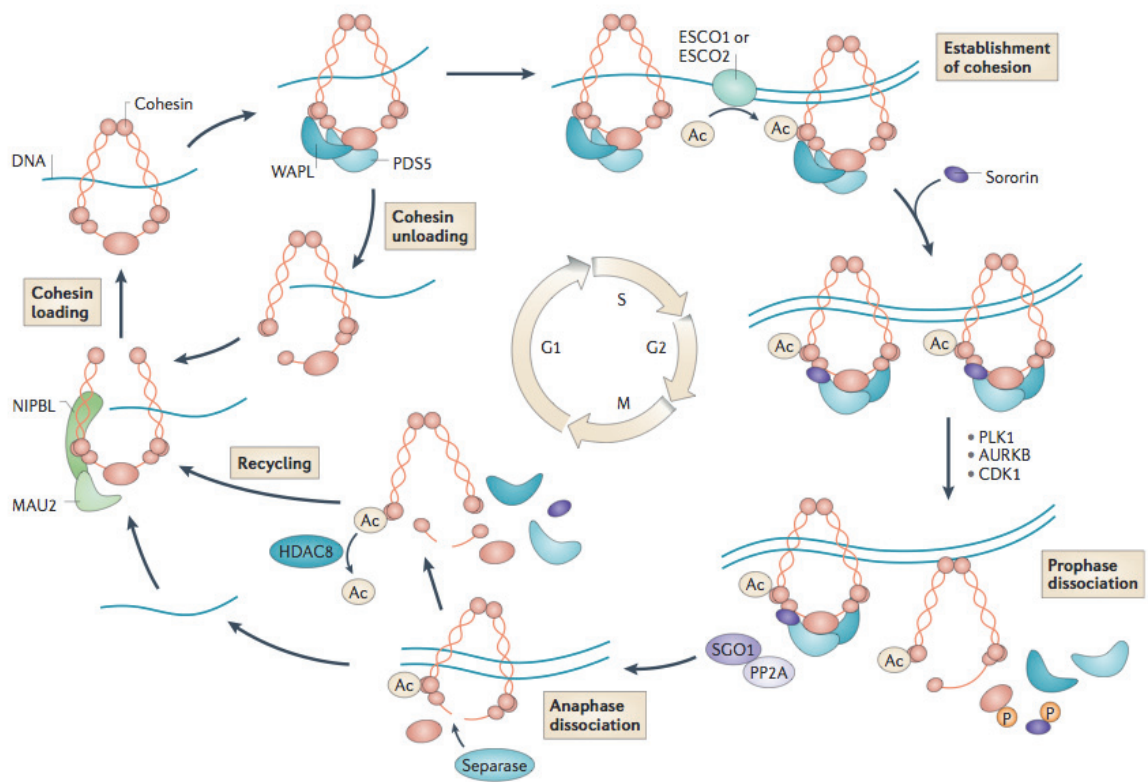


Figure 18. Le cycle des cohésines au cours du cycle cellulaire.

D'après (Losada 2014)

4 sous unités. La kleisine Scc1/Rad21 s'associe à l'hétérodimère Smc1-Smc3 en interagissant avec les deux domaines ATPases. La protéine Scc3 interagit avec Scc1. La structure du complexe forme un anneau protéique (Figure 17). L'intégrité de l'anneau est cruciale pour l'association de cohésine à la chromatine, qui s'y lie de façon topologique (Haering et al. 2002). Il existe une seconde forme de cohésine où la sous unité Scc1 est remplacée par Rec8 et qui s'associe à la chromatine lors de la méiose (A. J. Wood, Severson, et Meyer 2010).

Le chargement des cohésines à la chromatine en phase G1 nécessite l'hydrolyse de l'ATP par l'hétérodimère Smc1-Smc3 afin de permettre l'ouverture transitoire de l'anneau et l'entrée de l'ADN chromosomique. Cette ouverture se ferait au niveau du domaine charnière de l'hétérodimère Smc1-Smc3 (Gruber et al. 2006). L'association de cohésine à la chromatine fait intervenir un complexe annexe constitué des protéines NIPBL-MAU2 (Scc2-Scc4 chez *S. cerevisiae* ou Mis4-Ssl3 chez *S. pombe*). Une étude récente montre que cohésine est capable de se lier à l'ADN nu de façon topologique en présence d'ATP et de Mis4-Ssl3 (Murayama et Uhlmann 2014). A l'opposé, la dissociation des anneaux cohésines de la chromatine fait intervenir les facteurs WAPL et PDS5, qui s'associent à la cohésine sur la chromatine et induisent l'ouverture de l'anneau, provoquant ainsi sa dissociation (Tedeschi et al. 2013).

Comment cohésine assure la cohésion des chromatides demeure inconnu. Un modèle propose que cohésine assure la cohésion en piégeant deux molécules d'ADN sœurs à l'intérieur de son anneau. La cohésion résulterait de l'emprisonnement topologique des chromatides sœurs par les anneaux cohésine. Durant la phase G1, les cohésines encerclent une molécule d'ADN unique, non-répliquée, et leur association est constamment déstabilisée par l'action de WAPL. L'établissement de la cohésion a lieu en phase S, de façon couplée à la réplication, et nécessite l'acétylation de la sous unité Smc3 par l'acétyltransférase Eco1/Eso1/ESCO1 ou ESCO2. Cette modification prévient la dissociation des anneaux de cohésine de la chromatine par WAPL, stabilise l'association topologique, et engage les cohésines dans la cohésion des chromatides sœurs. Chez les vertébrés, l'acétylation de Smc3 permet l'association de la protéine sororine à la sous unité PDS5, ce qui inhibe l'activité dissociatrice de WAPL (Nishiyama et al. 2010).

En début de mitose, la majorité des cohésines est dissociée des chromosomes au moment de la résolution des chromatides sœurs. Cette dissociation serait le résultat de

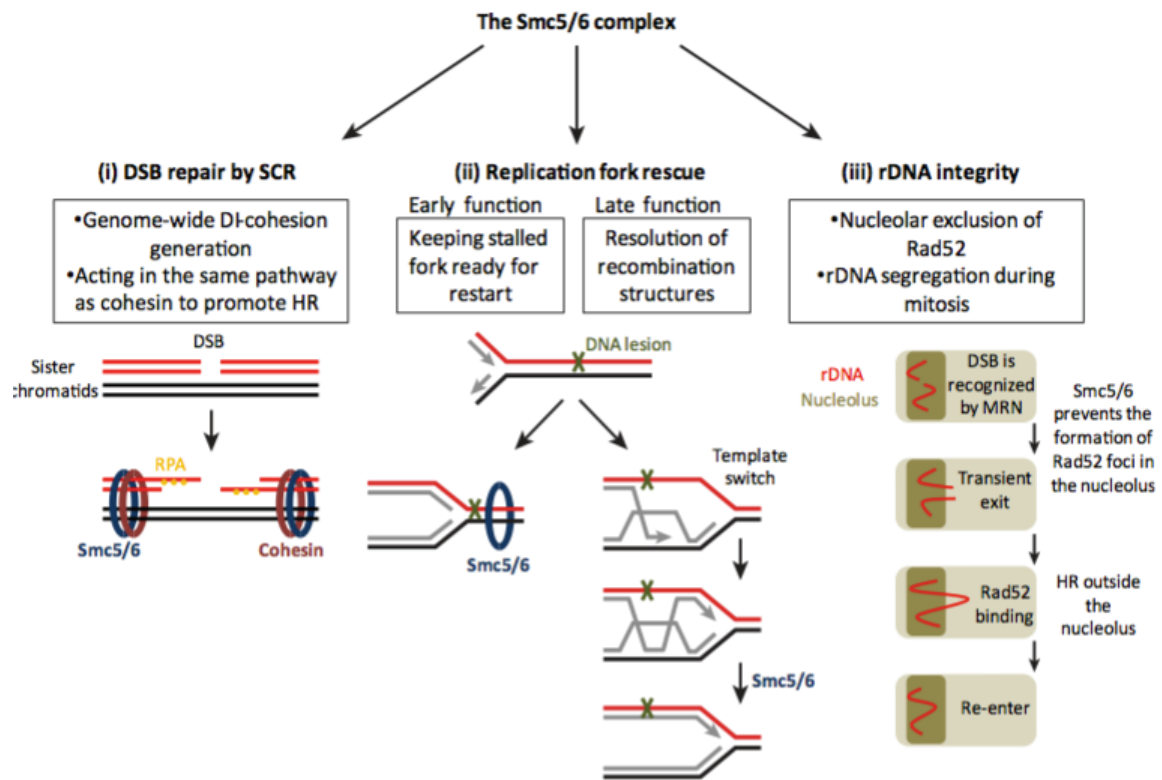


Figure 19. Fonctions du complexes Smc5-6.

D'après (Wu et Yu 2012) (DSB: double strand break, SCR: sister chromatid recombination).

la phosphorylation de la sororine par les kinases mitotiques (Nishiyama et al. 2010; Tedeschi et al. 2013). La sororine phosphorylée se dissocie des cohésines, rendant WAPL et PDS5 à nouveau capables de dissocier les anneaux de la chromatine. Cependant la réaction n'est pas totale. Des cohésines sont protégées de ces phosphorylations par le complexe SGO-PP2A, en particulier au niveau des centromères (W. Liu et al. 2010). Ce pool persistant assure la cohésion des chromatides sœurs jusqu'en métaphase, et sera éliminé par le clivage de la sous unité Kleisine Rad21/Scc1 par la séparase lors du déclenchement de l'anaphase (cf Chap. I- IB2 « sortie de mitose »).

3. Les condensines

La ressemblance structurale entre les complexes cohésine et condensine I et II a conduit à l'hypothèse que les condensines pourraient contribuer à la condensation des chromosomes en induisant et/ou en stabilisant des boucles de chromatine par l'emprisonnement d'une fibre de chromatine à l'intérieur de leurs anneaux (Tatsuya Hirano 2005). Il a été proposé que la différence de conformation des bras SMC entre les complexes condensines et cohésine (Figure 16B)(Anderson et al. 2002) refléterait le fait que cohésine assure des interactions topologiques intermoléculaires (entre molécules d'ADN sœurs), tandis que les condensines assureraient des interactions intramoléculaires impliquant une même molécule d'ADN. Les détails sur les modes d'association des condensines à la chromatine et la cartographie des sites chromosomiques occupés sont présentés dans les chapitres qui suivent.

4. Le complexe Smc5-6

Le complexe Smc5-6 est composé d'un hétérodimère Smc5-Smc6 associé à des protéines Nse (non Smc element). La protéine Nse4 interagit avec les 2 domaines ATPase de l'hétérodimère Smc5/6. Nse1 et Nse3 interagissent ensemble pour s'associer à Nse4. Nse2 s'associe à la région *coiled coil* de Smc5 et possède un rôle crucial pour la réparation de l'ADN via son activité de SUMO ligase (Figure 16) (Wu et Yu 2012).

Le complexe Smc5-Smc6 est impliqué dans la réparation des dommages à l'ADN de différentes manières suivant la nature des dommages. Ce dernier, en collaborant avec RPA et cohésine, est impliqué dans la réparation des cassures doubles brins de l'ADN

par recombinaison homologue entre les chromatides sœurs. En réponse à un dommage de l'ADN lors de la réplication, le complexe Smc5-Smc6 intervient dans la stabilisation de la fourche de réplication et la résolution des structures d'ADN après la recombinaison homologue. Enfin en réponse à un dommage de l'ADNr, le complexe Smc5-Smc6 intervient dans le recrutement de la protéine de recombinaison Rad52 au niveau de la région à réparer (Figure 19 ;(Wu et Yu 2012).

5. Le complexe SMC bactérien « condensin like »

Les homodimères SMC bactériens fixent l'ADN double brin *in vitro*. L'interaction est indépendante de l'ATP. En revanche, l'association à l'ADN est perdue quand la formation de l'homodimère SMC est altérée par une mutation du domaine charnière. Fixer l'ADN est donc une propriété de l'homodimère. L'analyse de la protéine SMC de *B. subtilis* par mutations de résidus a précisé le rôle du domaine charnière (M. Hirano et Hirano 2006). Des résidus lysine situés à proximité du domaine charnière permettent un premier contact avec l'ADN. L'interaction déclenche l'hydrolyse de l'ATP, la séparation des têtes ATPase et une ouverture des bras. Ce changement de conformation du dimère SMC expose un autre résidu lysine du domaine charnière qui stabilise l'interaction avec l'ADN, et rend possible le passage de la molécule d'ADN entre les bras *coiled coil* (M. Hirano et Hirano 2006). La kleisine bactérienne ScpB stabilise l'interaction des têtes ATPase des protéines SMC en inhibant l'hydrolyse de l'ATP et pourrait ainsi jouer le rôle de verrou une fois l'ADN encerclé par le dimère SMC. Le paradoxe est que, dans le cas d'un anneau condensine préformé (clos), la kleisine s'opposerait à l'entrée de la molécule d'ADN. Une analyse des interactions SMC/kleisine réalisée chez *E. coli* a apporté un éclaircissement en montrant que l'hydrolyse de l'ATP entraîne une rupture de contact entre la kleisine MuKF et une tête ATPase SMC, et donc potentiellement une ouverture transitoire de l'anneau (Woo et al. 2009). Une mutation dans la kleisine qui empêche sa dissociation d'avec SMC est létale, révélant que cette dissociation joue un rôle clef dans le fonctionnement de la condensine bactérienne.

Ainsi, les complexes Smc sont des enzymes anciennes, qui pré-datent les histones et dont le mode d'association aux chromosomes, fondé sur l'emprisonnement topologique de l'ADN, semble conservé au cours de l'évolution. L'hydrolyse de l'ATP par les sous

unités Smc entraîne une ouverture transitoire de l'anneau protéique, possiblement au travers d'un mécanisme allostérique permettant la capture de l'ADN. Les sous unités régulatrices, non-Smc, jouent, quant à elles, un rôle clef dans la régulation fine de l'activité ATPase, et donc dans l'association/dissociation des complexes d'avec l'ADN chromosomique.

C. Association des condensines à la chromatine

1. Localisation des condensines

1.1 Condensine I

Chez l'Homme, condensine I est cytoplasmique en interphase et s'associe massivement à la chromatine en prométaphase, après la rupture de l'enveloppe nucléaire, et y persiste jusqu'en télophase (Hirota et al. 2004; Ono et al. 2004). Condensine I a un comportement similaire chez *S. pombe* (Sutani et al. 1999). Le complexe est majoritairement cytoplasmique en interphase, transporté dans le noyau en début de mitose (l'enveloppe nucléaire ne se rompt pas chez les champignons) où il s'associe aux chromosomes jusqu'en télophase. Cependant des traces de condensine I semblent persister sur les chromosomes en interphase (Aono et al. 2002). Chez *S. cerevisiae*, en revanche, condensine I est trouvée associée à la chromatine tout au long du cycle cellulaire (Freeman, Aragon-Alcaide, et Strunnikov 2000; Bhalla, Biggins, et Murray 2002; D'Ambrosio et al. 2008) indiquant que l'association chromosomique de condensine I n'est pas suffisante pour la condensation mitotique.

Des expériences de FRAP sur des cellules humaines exprimant une kleisine étiquetée par la GFP ont montré que plus de 80% des condensine I s'associent aux chromosomes de façon dynamique (instable) en début de mitose contre 20% associées de façon stable (Gerlich et al. 2006). Ces résultats suggèrent que condensine I s'associe à la chromatine suivant au moins deux modes différents.

1.2 Condensine II

Condensine II est nucléaire (nucléo-soluble) pendant l'interphase, s'associe à la chromatine dès la prophase et y persiste jusqu'en télophase (Yeong et al. 2003; Hirota et al. 2004; Ono et al. 2004; Gerlich et al. 2006). Ainsi, condensine II précède condensine I sur la chromatine. Les mécanismes par lesquels condensine II persiste dans le noyau en interphase ne sont pas connus. Il a été montré qu'à l'exception des centromères, condensine I et II ne partagent pas les mêmes sites d'association aux chromosomes : les sous-unités régulatrices CAP-G (condensine I) et CAP-G2 (condensine II) détectées par immunofluorescence indirecte génèrent une alternance de signaux distincts le long de l'axe longitudinal des chromatides sœurs (Ono et al. 2003). De plus, la déplétion de CAP-G ou CAP-G2 par ARNi a révélé que les deux condensines s'associent à la chromatine de manière indépendante (Hirota et al. 2004). Condensine II semble fixer la chromatine de façon plus stable que condensine I dès la prophase (Gerlich et al. 2006). Ceci indique que les sous unités régulatrices jouent un rôle clef dans l'association des condensines à la chromatine en déterminant où, quand et comment la réaction a lieu.

1.3 Mode d'association topologique

Le(s) mécanisme(s) par lequel(s) les condensines s'associent à la chromatine et conduisent la condensation mitotique des chromosomes reste(nt) mal compris. Chez tous les organismes où l'association des condensines à la chromatine a été examinée, il a été observé que la perte de fonction d'une sous unité suffit à altérer la fixation des condensines et la condensation mitotique des chromosomes, indiquant que ces deux réactions sont liées et que seuls les holocomplexes sont compétents pour leur réalisation. Il est possible que les condensines soient initialement recrutées sur la chromatine par des interactions de type protéine-protéine et/ou protéine-ADN. Une fois condensine « posée » sur la chromatine, la proximité de l'ADN déclencherait l'hydrolyse de l'ATP, entraînant l'ouverture des bras SMC, l'entrée de la fibre de chromatine et la formation d'une boucle par un mécanisme qui reste à déterminer. La kleisine pourrait ensuite assurer un rôle stabilisateur en s'opposant à un nouveau cycle d'hydrolyse de l'ATP par les têtes SMC. La plupart des travaux suggèrent que l'association de

condensine est régulée par des modifications post transcriptionnelles telles que des phosphorylations, sumoylations ou encore acétylations.

Les ressemblances structurales entre condensine et cohésine ont depuis longtemps alimenté l'idée que l'association des condensines à la chromatine était de nature topologique, en encerclant deux segments distants d'une même molécule d'ADN à l'intérieur de l'anneau protéique. Les travaux de Cuylen et al. ont montré que l'association de condensine à l'ADN chromosomique est bien de nature topologique, et que l'intégrité de l'anneau de condensine est essentielle à sa fixation stable à la chromatine et à la condensation mitotique des chromosomes *in vivo* chez *S. cerevisiae* (Cuylen, Metz, et Haering 2011). Cependant, la dissociation des anneaux ouverts de condensines de la chromatine requiert des concentrations de sels plus élevées que pour les cohésines, suggérant l'existence de liaisons électrostatiques entre les condensines et la chromatine, en plus de la dimension topologique (Cuylen, Metz, et Haering 2011). En lien avec cette idée, il a été récemment montré que les domaines *HEAT repeats* des sous unités non-Smc de condensine I fixent l'ADN de façon aspécifique chez *S. cerevisiae*. Et cette association à l'ADN stimule l'activité ATPase des protéines Smc (Piazza et al. 2014). Il a été montré que condensine I et II fixent les histones. Chez *S. pombe*, la sous unité Cnd2 de condensine I interagit physiquement avec H2A et son variant H2A.z, suggérant que condensine I s'associe aux nucléosomes via Cnd2 (Tada et al. 2011). La phosphorylation de la partie N-terminale de Cnd2 par Aurora B stimule son association avec l'extrémité N-terminale de H2A (ou H2A.z) chargée positivement. De même, condensine II semble interagir avec l'histone H4K20me1 via les sous unités CAP-D3 et CAP-G2, et non avec H4K20me3 (W. Liu et al. 2010). Cette association des condensines aux histones pourrait servir d'ancrage à la chromatine avant ou après avoir encerclé l'ADN chromosomique.

Des analyses de mutants des condensine affectés pour la fixation ou l'hydrolyse de l'ATP ont cherché à déterminer le rôle de la fixation de l'ATP et de son hydrolyse sur le fonctionnement des condensines *in vivo* (Smith et al. 2004; Y. Xu et al. 2006; Hudson et al. 2008). Ni la fixation ni l'hydrolyse de l'ATP n'est requise pour l'assemblage de condensine I. En revanche, la fixation de l'ATP par condensine I est nécessaire à son association stable à la chromatine (Hudson et al. 2008). Au contraire, deux mutations

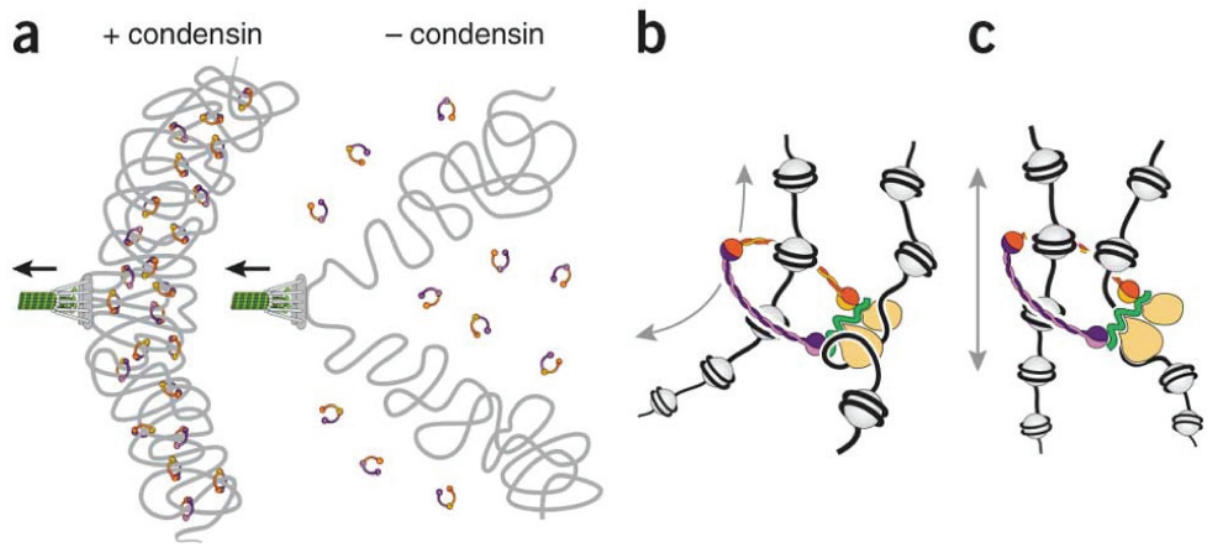


Figure 20. Modèle d'association des condensines à la chromatine.

A. Condensine condense les bras de chromosomes en créant des zones rigides. La perte de rigidité par le départ de condensine de la chromatine entraîne la décondensation **B-C.** Deux modes supposés d'association de condensine à la chromatine. Extrait de (Cuylen, Metz, et Haering 2011).

censées bloquer l'hydrolyse de l'ATP n'empêchent pas la présence de l'enzyme sur la chromatine, mais compromettent la structure des chromosomes. Ces observations suggèrent l'existence d'un complexe condensine I qui doit capter une ou deux molécules d'ATP pour fixer la chromatine. Plutôt que de permettre l'association initiale à la chromatine, l'hydrolyse de l'ATP libérerait l'énergie nécessaire au fonctionnement de condensine I. Ainsi, l'association de condensine I à la chromatine pourrait être découplée de la condensation. Alternativement, la fixation de l'ATP pourrait permettre un premier contact entre condensine I et la chromatine (électrostatique), tandis que l'hydrolyse de l'ATP pourrait ouvrir l'anneau et l'engager dans une interaction topologique efficace pour la condensation. Quel que soit le mécanisme, il semble clair que le fonctionnement de condensine I est étroitement lié à un cycle de fixation et d'hydrolyse de l'ATP par les sous unités SMC. On peut aisément imaginer qu'il en va de même pour condensine II.

Les travaux réalisés par Hudson et al. montrent que le clivage protéolytique du domaine *coiled coil* de la sous unité SMC2 n'induit pas une dissociation des condensines de la chromatine dans les cellules DT40 de poulet (Hudson et al. 2008). Ces résultats s'opposent à ceux de Cuylen et al. obtenus chez *S. cerevisiae* (Cuylen, Metz, et Haering 2011). Cependant, contrairement à Cuylen et al., Hudson et al. n'ont pas placé les sites de clivage de façon à ce qu'ils soient face à face dans les bras *coiled coil* de SMC2. Il est probable le clivage protéolytique de SMC2 n'ait pas entraîné l'ouverture de l'anneau condensine dans les cellules de poulet.

L'association des condensines se ferait suivant un modèle en deux temps. Le premier temps correspondrait au recrutement de condensine sur la chromatine via les répétitions HEAT des protéines régulatrices. Dans un second temps, l'hydrolyse de l'ATP par les têtes ATPases des sous unité SMC ouvrirait l'anneau et permettrait la capture topologique d'une ou plusieurs molécules d'ADN (Figure 20). A ce jour nous ne savons pas si un anneau de condensine encercle une ou plusieurs molécules d'ADN. Il s'agit d'une question centrale pour comprendre comment les condensines induiraient et/ou stabiliseraient des boucles de chromatines.

2. Les sites d'association chromosomiques des condensines et les différents mécanismes de recrutement

2.1 Cartographie des condensines I et II

Les sites d'association des condensines I et II sur l'ensemble du génome ont été déterminés par ChIP-chip (Chromatin Immunoprecipitation followed by microarray) ou ChIP-seq (Chromatin Immunoprecipitation followed by massive parallel sequencing analysis) chez les levures *S. cerevisiae*, *S. pombe*, chez *C. elegans*, le poulet (DT40) et la souris (cellules ES) (D'Ambrosio et al. 2008; Tanaka et al. 2012; Nakazawa et al. 2011; Kranz et al. 2013; J. H. Kim et al. 2013; Downen et al. 2013). Dans tous les cas, un même patron d'association a été observé, indiquant que les mécanismes de chargement et/ou de positionnement des condensines sur les chromosomes sont extrêmement conservés. Condensine I est enrichie au niveau des régions centromériques et péri-centromériques, des télomères, des ADN ribosomiques, et, le long des bras de chromosome, à proximité des gènes fortement transcrits indépendamment de leur classe transcriptionnelle (D'Ambrosio et al. 2008; Tanaka et al. 2012; Nakazawa et al. 2011; Kranz et al. 2013; J. H. Kim et al. 2013; Downen et al. 2013). La cartographie réalisée sur les cellules ES de souris (Downen et al. 2013) indique que condensine II est enrichie au niveau des promoteurs des gènes de classe II et au niveau des régions activatrices de la transcription de ces gènes appelées *enhancers* et *super enhancers* (Whyte et al. 2013). De même chez *C. elegans*, condensine II est enrichie au niveau des promoteurs et des *enhancers* (Kranz et al. 2013).

Aucune séquence d'ADN consensus des sites chromosomiques occupés par les condensines n'a été détectée, à l'exception des motifs B-Box trouvés dans les promoteurs des gènes de classe III, suggérant que les positions des condensines sur les chromosomes ne sont pas principalement définies au niveau ADN. En revanche, l'abondance des condensines à proximité des gènes fortement transcrits depuis les levures jusque chez les vertébrés indique l'existence d'un lien important entre l'association des condensines à la chromatine et une forte activité transcriptionnelle (cf ChapI-VI « Lien entre condensation et transcription »).

2.2 Mécanismes de chargement multiples et indépendants

Les données à disposition indiquent l'existence de plusieurs mécanismes de chargement des condensine I, apparemment indépendants et restreints en cis.

a. Mécanismes de chargement de condensine I

Condensine I est recrutée au niveau du domaine central des centromères par le complexe Pcs1/Mde4 chez *S. pombe* (Tada et al. 2011). La présence de condensine I au centromère nécessite également la fonction des protéines Mis6, Cnp1^{CENP-A} et Mis13, qui sont impliquées dans la formation de la chromatine sur laquelle est assemblée le kinétochore (Nakazawa et al. 2008). La présence de condensine I au niveau de l'ADNr est dépendante du facteur de transcription Acr1, et également de Pcs1/Mde4 (Nakazawa et al. 2008; Tada et al. 2011). L'association de condensine au niveau des gènes de classe III (ADNr) requiert le facteur de transcription TFIIC (D'Ambrosio et al. 2008). Ce dernier fixe directement l'ADN au niveau d'une séquence consensus appelée « B-box », présente dans les promoteurs des gènes de classe III. TFIIC interagit physiquement avec condensine I (Haeusler et al. 2008; Iwasaki et al. 2010).

La déficience de Pcs1 altère le recrutement de condensine aux centromères, au niveau des répétitions de l'ADN ribosomique et non aux sites bras de chromosomes. La déficience de Mis6, Cnp1^{CENP-A} ou Mis13, en revanche, n'affecte pas la localisation de condensine I à l'ADN ribosomique. Réciproquement, la défaillance du facteur Acr1 réduit la quantité de condensine au niveau de l'ADN ribosomique et non au niveau des centromères chez *S. pombe* (Nakazawa et al. 2008). Ces observations indiquent l'existence de multiples modes de recrutement indépendants de condensine I. Les mécanismes par lesquels Mis6, Cnp1^{CENP-A} ou Mis13, contribuent au recrutement de condensine I ne sont pas connus. Aucune interaction physique avec condensine I n'a été rapportée (Nakazawa et al. 2008). Il est possible que ces protéines soient requises pour la présence de Pcs1/Mde4 au centromère, ou que la structure de la chromatine joue un rôle dans le recrutement des condensines.

Les analyses de ChIP-chip chez *S. cerevisiae* ont montré que condensine s'associe à la chromatine tout au long du cycle cellulaire et sur la pleine longueur des chromosomes en des sites spécifiques d'environ 500pb et séparés par 2 à 45 kb (D'Ambrosio et al. 2008; S.-W. Wang et al. 2005). Les sites sont différents de ceux occupés par cohésine,

suggérant que les modes de chargement ou de relocalisation sont différents. Cependant, la sous unité Brn1 de condensine colocalise avec Scc2 au niveau des gènes ADNt chez *S. cerevisiae* (D'Ambrosio et al. 2008). Scc2 associée à Scc4 est impliquée dans le recrutement de cohésine. L'inactivation de Scc2 réduit l'enrichissement de condensine en certains sites chromosomiques, mais pas tous (D'Ambrosio et al. 2008). Aucune interaction directe n'a été détectée entre Scc2 et condensine (D'Ambrosio et al. 2008). Ces data suggèrent que le recrutement de condensine et cohésine, au niveau des gènes codants les ARNt, pourrait passer par un même mécanisme impliquant le complexe de chargement Scc2/Scc4. Une fois chargées en ces sites, les condensines et les cohésines ne se positionneraient pas aux mêmes endroits sur les chromosomes.

Chez *S. pombe*, Ssl3/Mis4 (l'homologue de Scc2/Scc4) est trouvée principalement à proximité des gènes fortement transcrits (Schmidt, Brookes, et Uhlmann 2009), rappelant la localisation des condensines. En revanche, aucun rôle pour Ssl3 et/ou Mis4 n'a été décrit à ce jour dans le chargement des condensines chez *S. pombe*.

b. Mécanismes de chargement pour condensine II

Chez la souris, les sites d'association de condensine II se superposent à ceux de cohésine et l'association de condensine II à la chromatine est dépendante du facteur NIPBL, homologue de Scc2 (Downen et al. 2013). La délétion de NIPBL par RNAi réduit l'association de condensine II à la chromatine. De plus la délétion de cohésine ou de condensine II modifie l'expression des gènes ES-spécifiques (Downen et al. 2013). Chez *C. elegans*, les sites occupés par condensine II chevauchent ceux occupés par SCC2 (Kranz et al. 2013). Condensine II pourrait être chargée sur les chromosomes par l'homologue de Scc2/Scc4. L'ensemble de ces data suggère que l'interaction fonctionnelle entre Scc2 et condensine I décrite chez *S. cerevisiae* est conservée chez *C. elegans* et la souris, mais avec condensine II. Curieusement, condensine I est associée aux chromosomes tout au long du cycle cellulaire chez *S. cerevisiae*, ce qui rappelle la localisation de condensine II. Il est donc tentant de spéculer que condensine I, chez *S. cerevisiae*, fonctionne plus comme une condensine II que comme une condensine I canonique.

c. Cas de condensine I^{DC}

Condensine I^{DC} s'associe aux chromosomes X, avec une forte affinité pour les séquence ADN de type GCGCAGGG (Kranz et al. 2013), et son recrutement dépend des protéines

SDC-2 et SDC3 (Davis et Meyer 1997; Dawes et al. 1999). Condensine I^{DC} fixe également des gènes autosomaux mais la seule présence du motif GCGCAGGG n'est pas suffisante pour son association, ce qui suggèrent que d'autres facteurs de chargement doivent intervenir (Kranz et al. 2013).

d. Recrutement des condensin-like bactériennes

Chez *Bacillus subtilis*, le complexe SMC bactérien est abondant au niveau de la séquence ADN ParS et à proximité des gènes fortement transcrits. Le complexe SMC est recruté au site ParS par la protéine Spo0J. En revanche, cette dernière n'a pas d'effet notable sur la présence des SMC à proximité des gènes fortement transcrits (Gruber et Errington 2009). Ces observations suggèrent à nouveau l'existence de multiples voies d'association de condensine, indépendantes, et d'un lien avec la transcription.

L'ensemble des données à disposition suggère que l'association des condensines à la chromatine se ferait en deux temps : le recrutement à proximité de la chromatine par des facteurs de chargement multiples suivi de l'association topologique de condensine à la chromatine. Au moins deux grands mécanismes de chargement cohabiteraient, l'un impliquant de facteurs sites spécifiques (Pcs1, Spo0J), l'autre, encore inconnu, opérant au niveau des gènes fortement transcrits.

D. Régulation des condensines

Chez *S. cerevisiae*, l'association de condensine I à la chromatine est constante au cours du cycle du cellulaire (D'Ambrosio et al. 2008). De même, condensine II est présente dans le noyau dès l'interphase. Pourtant la condensation mitotique reste couplée à la mitose. Ceci implique que l'activité de condensation des condensines est régulée au cours du cycle cellulaire. Cette régulation est bien sûr fondée sur des modifications post-traductionnelles des sous unités des condensines. Dans les cellules humaines, condensine I est phosphorylée tout au long du cycle cellulaire (Takemoto et al. 2006). Cependant le pattern de phosphorylation diffère entre l'interphase et la mitose, suggérant que la phosphorylation de condensine I régule son association et/ou son activité de condensation. Chez *S. cerevisiae*, 18 sites phosphorylés en mitose ont été

déTECTÉS par spectrométrie de masse (Bazile, St-Pierre, et D'Amours 2010). Ainsi, condensine I est l'objet de régulations effectuées par des protéines kinases, telles que CDK1/Cdc2 en début de mitose, Polo/Plo1 en anaphase et Aurora-B. Condensine I fait également l'objet de régulations effectuées par des phosphatases telles PP2A et Cdc14 (Kimura et al. 1998; Ono et al. 2004; Takemoto et al. 2006; Lipp et al. 2007; St-Pierre et al. 2009; Bazile, St-Pierre, et D'Amours 2010).

1. Régulation par les kinases CDK1/Cdc2 et Polo PLK1/cdc5

CDK1-cycline B est capable de phosphoryler les sous unités régulatrices CAP-D2 et CAP-H de condensine I *in vitro*, ce qui stimule son activité de super-enroulement de l'ADN (Kimura et al. 1998) En revanche cette phosphorylation n'augmente pas la capacité de condensine à s'associer à l'ADN *in vitro*. Chez *S. pombe*, la phosphorylation du résidu Thr9 de SMC4/Cut3 par Cdk1 provoque la rétention de condensine I dans le noyau en mitose (Sutani et al. 1999; Nakazawa et al. 2008). Chez *S. cerevisiae*, la phosphorylation de Smc4 par Cdk1 facilite l'hyper-phosphorylation des sous unités régulatrices de condensine I par la kinase Polo/Plo1 (St-Pierre et al. 2009). Cette phosphorylation par Polo augmente l'activité de super-enroulement de condensine et contribue à la condensation des chromosomes en anaphase lorsque le taux de CDK1 chute (St-Pierre et al. 2009). Dans les cellules humaines, condensine II est phosphorylée par CDK1 au niveau de la Thr1415 de CAP-D3, qui est hautement conservée (Abe et al. 2011). Nécessaire aux phases initiales de la condensation, cette phosphorylation crée un module de fixation pour le PBD (Polo Box Domain). Ainsi la kinase Polo, PKL1, s'associe à CAP-D3 via son PBD et hyper-phosphoryle l'ensemble de condensine II. Cette hyper-phosphorylation est nécessaire à l'assemblage des chromosomes mitotiques (Abe et al. 2011).

L'ensemble des données actuelles montre que les kinases mitotiques CDK1 et PLK1 sont des acteurs clefs de la condensation en activant les condensines. Cependant, le lien entre hyperphosphorylation des condensines et association avec la chromatine demeure mal compris. Notamment l'impact des phosphorylations par Polo ou Cdk1 sur l'association de condensine I à la chromatine n'a pas été exploré (St-Pierre et al. 2009).

2. Régulation par Aurora B/Ipl1

La kinase Aurora B fait partie du complexe CPC (chromosomal passenger complex) et est impliquée dans la condensation des chromosomes mitotiques dans de nombreuses espèces. Cependant, le rôle exact d'Aurora-B semble varier d'un organisme à l'autre. Il a été montré qu'Aurora-B joue un rôle essentiel dans le recrutement de condensine I sur les chromosomes chez la drosophile (Giet et Glover 2001), chez *C. elegans* (Hagstrom et al. 2002) et chez *S. pombe*, où la phosphorylation par Aurora B/Ark1 des résidus Ser 5, Ser 41 et Ser 52 situés dans région N-terminale de Cnd2 est nécessaire à la fixation de condensine et à la condensation des chromosomes (Pettersen 2003, Tada et al. 2001, Nakazawa et al. 2011). Au contraire, chez *S. cerevisiae*, l'association de condensine I à la chromatine ne dépend pas de l'activité de Aurora B (Losada, Hirano, et Hirano 2002), bien que cette dernière soit essentielle en anaphase pour le maintien de la condensation de l'ADN ribosomique (Lavoie, Hogan, et Koshland 2004). Dans le système acellulaire d'extrait d'œufs de Xénope, la déplétion d'Aurora B n'impacte pas ou peu l'association de condensine I à la chromatine (MacCallum et al. 2002; Takemoto et al. 2007). Chez l'homme, les données ne sont pas claires. Certains résultats suggèrent que l'activité d'Aurora B contribue à l'association de condensine I à la chromatine, et non à celle de condensine II (Lipp et al. 2007). D'autres travaux, au contraire, suggèrent qu'Aurora B participe à la localisation de condensine II au centromère, mais n'est requise ni pour l'association de condensine I ni pour celle de condensine II le long des bras de chromosome (Ono 2004). Il est possible qu'Aurora B contribue partiellement à l'association de condensine I, et que les effets de la perte de fonction d'Aurora B mesurés sur l'association de condensine I varient selon les techniques expérimentales employées.

3. Régulation par CKII

L'activité de condensation des condensines doit être réprimée ou du moins contrôlée en interphase. La protéine CKII (caséine kinase) régule négativement l'activité de super enroulement de condensine I par phosphorylation, en interphase, dans les cellules humaines (Takemoto et al. 2006). C'est à ma connaissance le seul cas clairement montré de régulation négative de condensine I. Cette activité CKII existerait chez *S. pombe* au sein d'un complexe appelé NCT (Nrc1-CKII-TAFs) (H.-S. Kim et al. 2014). Ces résultats

suggèrent qu'une phosphatase, non identifiée jusqu'alors, doit intervenir en début de mitose pour lever cette inhibition.

4. Régulation par les phosphatases

Chez *S. cerevisiae*, Smc4 est phosphorylée par Cdk1 en début de mitose puis déphosphorylée par Cdc14 au niveau de la sérine 128 en fin de mitose (Kao et al. 2014). Cdc14 semble réguler l'association de condensine à l'ADN ribosomique de façon positive en début d'anaphase (Damien D'Amours et Amon 2004) puis négative en fin d'anaphase (Varela et al. 2009). En effet, Cdc14 activée par le système FEAR permet le recrutement de condensine à la chromatine au niveau nucléolaire en favorisant la sumoylation de la sous unité régulatrice Ysc4 en début d'anaphase (Damien D'Amours et Amon 2004). Au contraire, l'activation de Cdc14 par le système MEN en fin d'anaphase coïncide avec la décompaction de l'ADN ribosomique et la dissociation de la sous unité kleisine Brn1 de la chromatine (Varela et al. 2009). Les cibles de Cdc14 seraient donc différentes en début et fin d'anaphase.

De même, dans les cellules humaines et les cellules d'œuf de Xénope, la phosphatase PP2A (protéine phosphatase 2A) régule l'association de condensine II de façon positive et négative (Takemoto et al. 2009). Durant l'anaphase, PP2A déphosphoryle la sous unité CAP-H2, ce qui permet la dissociation de condensine II de la chromatine en fin de mitose. Au contraire en début de mitose, PP2A participe à la condensation mitotique des chromosome positivement en recrutant condensine II et la protéine KIF4 sur la chromatine, mais PP2A assure cette fonction indépendamment de son activité catalytique (Takemoto et al. 2009).

5. Régulations par acétylation et sumoylation

L'interrogation de l'acétylome humain révèle que les sous unité SMC2 et SMC4 sont acétylées (Bazile, St-Pierre, et D'Amours 2010). Cependant le rôle de ces acétylations dans la condensation mitotique et/ou les autres fonctions des condensines, et acétyltransférases responsables de ces modifications sont inconnus.

Chez *S. cerevisiae*, la sous unité Ycs4 est sumoylée spécifiquement en anaphase (Damien D'Amours, Stegmeier, et Amon 2004). La surexpression de Cdc14 est suffisante pour

induire la sumoylation de Ysc4 et entrainer le recrutement de condensine au niveau de l'ADNr et engendrer la séparation des chromatides sœurs au niveau des répétitions ADNr. Donc, la sumoylation de la sous-unité Ysc4 contrôlée par Cdc14 semble être impliquée dans la ségrégation des ADNr en anaphase.

V- Modification de la chromatine, condensation des chromosomes et association des condensines

La chromatine est le substrat des condensines et de la réaction de condensation mitotique. Il n'est donc pas surprenant que des modifications d'histones prennent part, directement ou indirectement à la condensation mitotique des chromosomes. La première évidence en faveur d'un rôle pour les modifications d'histone dans la condensation mitotique fut la découverte de la phosphorylation de la serine 10 de l'histone H3 (H3S10) par la kinase Aurora B, de façon concomitante de la condensation mitotique (Hendzel et al. 1997). Toutefois, la phosphorylation de H3S10 n'est pas essentielle à la condensation mitotique des chromosomes chez *S. cerevisiae*, ni au recrutement des condensines dans le système acellulaire d'extrait d'œufs de Xénope (Lavoie, Hogan, et Koshland 2002; MacCallum et al. 2002). La phosphorylation de H3S10 n'est pas non plus essentielle à la viabilité cellulaire chez *S. pombe* (Mellone et al. 2003), suggérant que son rôle dans la condensation serait secondaire ou redondant.

En revanche, il a été montré que la dé-acétylation de l'histone H4 par l'histone dé-acétylase Rpd3 est nécessaire et suffisante au recrutement massif de condensine I au niveau de l'ADN ribosomique en réponse à une carence nutritionnelle chez *S. cerevisiae* (Tsang, Li, et Zheng 2007). Condensine I fixe le variant d'histone H2A.Z (Tada et al. 2011). Chez *S. pombe*, l'acétylation de H2A.Z par l'acétyl-transférase Mst1 est essentielle à l'association stable de condensine I à la chromatine en anaphase (H.-S. Kim et al. 2009). La localisation chromosomique du complexe condensine I^{DC} de *C. elegans* est liée à des modifications de la chromatine. Le système de compensation de dosage entraîne une mono-méthylation de l'histone H4K20 sur les chromosomes X, ce qui induit la répression des gènes des chromosomes X. Condensine I^{DC} colocalise avec H4K20me1 et son association à la chromatine précède l'apparition de ces marques épigénétiques (Vielle et al. 2012), ce qui suggère que condensine I^{DC} serait à l'origine de cette

modification d'histones. Condensine II interagit physiquement avec H4K20me1 (W. Liu et al. 2010). Une hypothèse serait que condensine^{DC} induirait la méthylation de H4K20, et fixerait cette même modification, stabilisant son association avec la chromatine.

Les liens entre condensines et les modifications d'histones peuvent également être négatifs. L'acétylation de H3K56 au niveau des rétrotransposons entraîne la dissociation de condensine I chez *S. pombe* (A. Tanaka et al. 2012). Cette marque interfère avec la localisation chromosomique des protéines pKU70 et pKU80 qui recrutent condensine I au niveau des rétrotransposons. De même, aux centromères chez *S. pombe*, l'histone H4 acétylée serait fixée par le complexe NCT (Nrc1-CKII-TAFs), inhibiteur condensine I (H.-S. Kim et al. 2014). Le complexe NCT est composé de la protéine Nrc1 (negative regulator of condensin 1), qui appartient à la famille BET (tandem Bromodomains and Extra Terminal domain), la protéine kinase CKII et cinq protéines TAF (TBP associated factor). Associé à la chromatine via sa sous-unité Nrc1 qui reconnaît l'acétylation de H4, et les protéines TAF, le complexe NCT régulerait négativement le complexe condensine via son activité caséine kinase CKII (H.-S. Kim et al. 2014).

L'ensemble de ces observations illustre la capacité des modifications d'histones à affecter l'association des condensines à la chromatine, et/ou leur activité, parfois au niveau sub-chromosomique. Cependant, les modifications d'histones peuvent également impacter la condensation mitotique des chromosomes indépendamment des condensines. Une récente étude chez *S. cerevisiae* indique que H3S10 phosphorylée par Aurora B engendre le recrutement de la de-acétylase Hst2 qui dé-acétyle l'histone H4 lysine 16 (H4K16). L'histone H4 se lie alors aux nucléosomes voisins stimulant la compaction de la chromatine (Wilkins et al. 2014). Cependant, la viabilité du mutant H3S10A, dans lequel l'histone H3 est non phosphorylable en position 10 (Lavoie, Hogan, et Koshland 2002), implique que la phosphorylation de H3S10 joue un rôle secondaire ou redondant dans la condensation mitotique de la chromatine.

VI- Lien entre condensation et transcription

Depuis les bactéries jusque chez l'Homme, les condensines sont trouvées enrichies à proximité des gènes fortement transcrits. La grande conservation de ce patron d'association indique l'existence d'un lien positif, important, entre l'association de condensine à la chromatine et un fort taux de transcription. Cette conclusion est

confortée par l'implication de facteurs de transcription tels que TFIIC et Acr1 dans l'association de condensine I à la chromatine (D'Ambrosio et al. 2008; Nakazawa et al. 2008). La nature de ce lien demeure énigmatique en revanche.

Paradoxalement, condensine I s'associe massivement à la chromatine en mitose, alors que la transcription est généralement inhibée durant cette phase du cycle cellulaire (Taylor 1960). Même chez *S. cerevisiae*, la transcription de l'ADNr cesse en mitose (Andrés Clemente-Blanco et al. 2009). De plus, il a été montré que la transcription par les ARN Pol I et Pol II s'oppose à la fixation de condensine I sur la chromatine (Andrés Clemente-Blanco et al. 2009; Andres Clemente-Blanco et al. 2011). La phosphatase Cdc14 inhibe l'activité de l'ARN polymérase II au niveau des régions de séquences répétées, permettant le chargement de condensine I (Clemente-Blanco et al. 2011). L'ensemble de ces observations conduit donc à un paradoxe apparent où, d'un côté, condensine semble liée positivement à la transcription pour son association à la chromatine, et, de l'autre, fixation de condensine et transcription sont antagonistes.

Une possibilité serait que la fixation de condensine I soit liée non à la transcription en tant que telle, mais à des facteurs ou des propriétés associés à la transcription qui persistent en mitose malgré le silence transcriptionnel. L'inhibition chimique de l'ARN pol III n'affecte pas la localisation de condensine I sur les ADN de transfert chez *S. cerevisiae* (D'Ambrosio et al. 2008), suggérant que la fixation de condensine en ces sites n'est pas directement liée à l'activité transcriptionnelle de l'ARN pol III.

Des modifications de la chromatine et/ou certains facteurs de transcriptions persistent sur les chromosomes en mitose (Xing, Vanderford, et Sarge 2008). Ces marques transcriptionnelles sont considérées servir de base moléculaire à une mémoire épigénétique de la transcription durant la mitose. On parle de *gene bookmarking*. Ce processus permettrait de conserver la mémoire du programme transcriptionnel enclenché durant l'interphase pendant la traversée de la mitose.

Un lien négatif a été décrit entre le *gene bookmarking* et l'association de condensine à la chromatine. TFIID persiste aux promoteurs de gènes de réponse au stress pendant la mitose et y recrute PP2A dont l'activité phosphatase inhibe condensine I (Xing, Vanderford, et Sarge 2008). L'ensemble de ces data suggère que la répression de la transcription doit être effectuée pour permettre le chargement des condensines à la chromatine.

Le lien entre l'association des condensines à la chromatine et la transcription reste à élucider. Chez les eucaryotes, il est possible que l'environnement chromatinien influence positivement ou négativement la fixation de condensine selon le gène considéré. Cependant, la conservation de l'enrichissement des condensines à proximité des gènes fortement transcrits chez les procaryotes implique que le lien condensine / transcription pourrait être fondé, au moins en partie, sur des propriétés indépendantes des histones. La fixation de facteurs de transcription et/ ou la topologie de l'ADN (super-enroulement) pourraient être certaines de ces propriétés.

VII- Problématique et objectifs

Condensine est considéré comme un organisateur universel du génome et un acteur clef de la condensation mitotique des chromosomes. Cependant, comment condensine s'associe à la chromatine et, dans ce contexte, assure ses fonctions en lien avec le cycle cellulaire demeure mal compris. Ceci tient au moins en partie au fait que nous ne connaissons pas l'ensemble des acteurs mis en jeu.

Plusieurs mécanismes de chargement des condensine semblent fonctionner au niveau sub-chromosomique. La structure de la chromatine semble également influencer la fixation de condensine aux chromosomes. Cependant les mécanismes moléculaires sous jacents demeurent en grande partie ignorés. Enfin, un lien important, conservé au cours de l'évolution, existe entre la transcription et la fixation et/ou le positionnement des condensines sur les chromosomes. Mais la nature de ce lien est également ignorée.

L'objectif de mon travail de thèse était d'améliorer notre compréhension des mécanismes mis en jeu dans la condensation mitotique des chromosomes (1) par la recherche de facteurs qui collaborent avec condensine I chez *S. pombe* et (2) par la caractérisation fonctionnelle de l'un d'entre eux.

Dans ce manuscrit, je présente les résultats d'un crible génétique conçu pour identifier les collaborateurs de condensine, et l'étude du rôle de l'histone acétyl-transférase Gcn5, identifiée par ce crible, dans l'association de condensine I à la chromatine et la condensation mitotique des chromosomes.

Chapitre II : Matériels et Méthodes

I- Matériel biologique

A. *Schizosaccharomyces pombe*

S. pombe est une levure ascomycète. Toutes les souches dérivent d'un même ancêtre nommé SP972. La cellule est de forme cylindrique et sa taille est d'environ 3-4 µm de diamètre pour 7 à 15 µm de longueur. Le génome haploïde comprend 12.6 Mpb d'ADN répartis sur 3 chromosomes. Le cycle biologique est haplo-diplobiontique avec une phase haploïde dominante. Le temps de génération est compris entre 2 et 4h suivant les conditions de culture. Le cycle cellulaire haploïde est typiquement eucaryotique, avec quatre phases : G1, S, G2 et M. En condition de croissance exponentielle, 80% des cellules sont en phase G2, 10% en mitose et 10% en G1/S.

En condition de carence nutritionnelle, deux cellules haploïdes de types sexuels opposés (h⁺ et h⁻) conjuguent : les cellules fusionnent par une extrémité et la caryogamie est réalisée (16-24h). La méiose est alors déclenchée (>24h), suivie par la genèse d'un asque contenant 4 spores haploïdes. L'asque se rompt et, en conditions nutritives favorables, les spores germent et le cycle cellulaire haploïde recommence. Si le zygote issu de la conjugaison de deux cellules haploïdes est placé en conditions nutritives favorables avant le déclenchement de la méiose, alors un cycle diploïde végétatif peut s'établir.

1. La souche *cut3-477 pREP41-cut3⁺*

La souche testeuse *cut3-477 pREP41-cut3⁺* a été construite par P. Bernard. Cette souche possède la mutation récessive *cut3-477* (Saka et al. 1994) au locus *cut3*, plus un gène chimérique *pREP41-cut3⁺* inséré dans le génome en position ectopique. *pREP41* est une version atténuée du promoteur *nmt1* (no message in thiamine) dont l'activité est réprimée par la thiamine (vitamine B1). *S. pombe* est prototrophe pour la thiamine. En l'absence de thiamine dans le milieu de culture, le promoteur *nmt1* est actif (Basi, Schmid, et Maundrell 1993; Maundrell 1990; Maundrell 1993). En présence de thiamine (20 µM), les cellules concentrent la vitamine, entraînant une répression du promoteur

Numéro de souche

Génotypes

Figure 21 :

L113	<i>h-</i>	<i>leu1-32 ura4D18 ade6-210</i>
LY1069	<i>h-</i>	<i>leu1-32 ura4D18 cut3-477ts</i>
LY270	<i>h-</i>	<i>leu1-32 ura4D18 nda3-KM311cs</i>
LY1802	<i>h-</i>	<i>leu1-32 ura4D?nda3-KM311 cnd2-gfp-LEU2</i>
LY2098	<i>h-</i>	<i>leu1-32 ura4D?nda3-KM311 cut3-477</i>

Figure 22

L113	<i>h-</i>	<i>leu1-32 ura4D18 ade6-210</i>
LY1069	<i>h-</i>	<i>leu1-32 ura4D18 cut3-477ts</i>
LY42	<i>h-</i>	<i>leu1-32top2-250cs</i>
LY78	<i>h-</i>	<i>leu1-32 cut3-477 pREP41XL-cut3-LEU2</i>
LY75	<i>h-</i>	<i>leu1-32 cut3-477 top2-250 pREP41XL-cut3-LEU2</i>

Figure 24

L113	<i>h-</i>	<i>leu1-32 ura4D18 ade6-210</i>
LY1069	<i>h-</i>	<i>leu1-32 ura4D18 cut3-477</i>
LY360	<i>h-</i>	<i>leu1-32 ura4D18 ade6-216 cut3-477 pREP41XL-cut3-LEU2</i>
LY725	<i>h-</i>	<i>leu1-32 ura4-D? ade6-210 slc90</i>
LY860	<i>h-</i>	<i>leu1-32 ura4D18 ade6-210 slc173</i>
LY962	<i>h-</i>	<i>leu1-32 ura4D? ade6-216 slc129</i>
LY536	<i>h-</i>	<i>leu1-32 ura4D? ade6-216 cut3-477 pREP41XL-cut3-LEU2 slc90</i>
LY612	<i>h-</i>	<i>leu1-32 ura4D? ade6-216 cut3-477 pREP41XL-cut3-LEU2 slc173</i>
LY564	<i>h-</i>	<i>leu1-32 ura4D? ade6-216 cut3-477pREP41XL-cut3-LEU2 slc129</i>
LY854	<i>h-</i>	<i>leu1-32 ura4D? ade6-216 slc47</i>
LY1066	<i>h-</i>	<i>leu1-32 ura4D18 ade6-216 slc71</i>
LY862	<i>h-</i>	<i>leu1-32 ura4D18 ade6-210 slc85</i>
LY852	<i>h-</i>	<i>leu1-32 ura4D? ade6-210 cut3-477 slc47</i>
LY1062	<i>h-</i>	<i>leu1-32 ura4D18 ade6-216 cut3-477 slc71</i>
LY864	<i>h-</i>	<i>leu1-32 ura4D18 ade6-210 cut3-477 slc85</i>

Figure 25

L113	<i>h-</i>	<i>leu1-32 ura4D18 ade6-210</i>
LY1069	<i>h-</i>	<i>leu1-32 ura4D18 cut3-477</i>
LY28	<i>h-</i>	<i>leu1-32 ura4D18 ade6-210 pcs1Δ::ura4+</i>
LY688	<i>h-</i>	<i>leu1-32 ura4D18 ade6-216 rad3Δ::ura4+</i>
LY1066	<i>h-</i>	<i>leu1-32 ura4D18 ade6-216 slc71</i>
LY862	<i>h-</i>	<i>leu1-32 ura4D18 ade6-210 slc85</i>
LY725	<i>h-</i>	<i>leu1-32 ura4-D? ade6-210 slc90</i>
LY962	<i>h-</i>	<i>leu1-32 ura4D? ade6-216 slc129</i>
LY860	<i>h-</i>	<i>leu1-32 ura4D18 ade6-210 slc173</i>
LY854	<i>h-</i>	<i>leu1-32 ura4D? ade6-216 slc47</i>
LY1242	<i>h-</i>	<i>leu1-32 ura4D? ade6-210 slc127</i>

nmt1. Concernant la souche testeuse *cut3-477 pREP41-cut3⁺*, sur milieu PMG dépourvu de thiamine, le promoteur *pREP41* est actif, le gène *cut3⁺* est exprimé et complémente la mutation *cut3-477*, et la souche se comporte comme une souche sauvage à 32°C. En présence de thiamine, le promoteur *pREP41* est réprimé et la souche testeuse se comporte comme le mutant *cut3-477*.

2. Les souches mutantes

Certaines souches proviennent des équipes de J.P. Javerzat, A. Verdel, R. Allshire. Les souches utilisées dans ce travail ont été obtenues par croisement ou par transformation. L'ensemble des souches utilisées dans ce travail est listé par figure.

B. Bactéries électrocompétentes *Escherichia Coli*

Pour les transformations bactériennes, seules les bactéries *E. Coli* ultracompétentes DH5 α (Life Technologies) ou NEB10 β -High Efficiency (New England Biolabs) ont été utilisées.

II- Méthodes

A. Méthode de culture

1. Milieu de culture

1.1 *S. pombe*

Les milieux de culture utilisés sont ceux décrits par (Forsburg et Rhind 2006; Moreno, Klar, et Nurse 1991). Le milieu synthétique utilisé est le PMG (Pombe Minimum Glutamate) et le milieu complet est le YES+A. Pour les croisements, un milieu carencé en azote, SPA (sporulation agar media), est utilisé. La phloxine B (2,5 mg/l), la thiamine (20 μ M) et/ou les drogues (G418 : 100mg/l - Clonat : 100 μ g/l - Hygromycin B : 100mg/l) sont ajoutées après autoclavage à 110°C pendant 30 minutes.

Figure 26

LY988	<i>h+/h-</i>	<i>leu1-32/ leu1-32 ura4D?/ ura4D? ade6-210/216 cut3-477/cut3-477 pREP-cut3-LEU2/pREP-cut3-LEU2</i>
LY989	<i>h+/h-</i>	<i>leu1-32/ leu1-32 ura4D?/ ura4D? ade6-210/216 cut3-477/cut3-477 pREP-cut3-LEU2/pREP-cut3-LEU2 slc129/ slc129+</i>
LY990	<i>h+/h-</i>	<i>leu1-32/ leu1-32 ura4D?/ ura4D? ade6-210/216 cut3-477/cut3-477 pREP-cut3-LEU2/pREP-cut3-LEU2 slc129/slc129</i>
LY971	<i>h+/h-</i>	<i>leu1-32/ leu1-32 ura4D?/ ura4D? ade6-210/216 cut3-477/cut3-477</i>
LY993	<i>h+/h-</i>	<i>leu1-32/ leu1-32 ura4D?/ ura4D? ade6-210/216 cut3-477/cut3-477 slc85/ slc85+</i>
LY994	<i>h+/h-</i>	<i>leu1-32/ leu1-32 ura4D?/ ura4D? ade6-210/216 cut3-477/cut3-477 slc85/slc85</i>
LY985	<i>h+/h-</i>	<i>leu1-32/ leu1-32 ura4D?/ ura4D? ade6-210/216 cut3-477/cut3-477 slc47/ slc47+</i>
LY986	<i>h+/h-</i>	<i>leu1-32/ leu1-32 ura4D?/ ura4D? ade6-210/216 cut3-477/cut3-477 slc47/slc47</i>
LY664	<i>h+/h-</i>	<i>leu1-32/ leu1-32 ura4D18/ ura4D18 ade6-210/216</i>
LY963	<i>h+/h-</i>	<i>leu1-32/ leu1-32 ura4D?/ ura4D? ade6-210/216 slc173/ slc173+</i>
LY964	<i>h+/h-</i>	<i>leu1-32/ leu1-32 ura4D?/ ura4D? ade6-210/216 slc173/slc173</i>
LY665	<i>h+/h-</i>	<i>leu1-32/ leu1-32 ura4D18/ ura4D? ade6-210/216 slc90/ slc90+</i>
LY672	<i>h+/h-</i>	<i>leu1-32/ leu1-32 ura4D?/ ura4D? ade6-210/216 slc90/slc90</i>
LY1157	<i>h+/h-</i>	<i>leu1-32/ leu1-32 ura4D18/ ura4D18 ade6-210/216 slc71/ slc71+</i>
LY1160	<i>h+/h-</i>	<i>leu1-32/ leu1-32 ura4D18/ ura4D? ade6-210/216 slc71/slc71</i>

Figure 27

LY664	<i>h+/h-</i>	<i>leu1-32/ leu1-32 ura4D18/ ura4D18 ade6-210/216</i>
LY665	<i>h+/h-</i>	<i>leu1-32/ leu1-32 ura4D18/ ura4D? ade6-210/216 slc90/ slc90+</i>
LY666	<i>h+/h-</i>	<i>leu1-32/ leu1-32 ura4D18/ ura4D18 ade6-210/216 cut14-208/cut14+</i>
LY667	<i>h+/h-</i>	<i>leu1-32/ leu1-32 ura4D18/ ura4D? ade6-210/216 slc90/cut14-208</i>
LY672	<i>h+/h-</i>	<i>leu1-32 leu1-/32 ura4D?/ ura4D? ade6-210/216 slc90/slc90</i>
LY673	<i>h?</i>	<i>leu1-32/ leu1-32 ura4D?/ ura4D? ade6-210/216 cut14-208/cut14-208</i>
LY963	<i>h+/h-</i>	<i>leu1-32/ leu1-32 ura4D?/ ura4D? ade6-210/216 slc173/ slc173+</i>
LY1157	<i>h+/h-</i>	<i>leu1-32/ leu1-32 ura4D18/ ura4D18 ade6-210/216 slc71/ slc71+</i>
LY1158	<i>h+/h-</i>	<i>leu1-32/ leu1-32 ura4D18/ ura4D? ade6-210/216 slc71/slc173</i>
LY964	<i>h+/h-</i>	<i>leu1-32/ leu1-32 ura4D?/ ura4D? ade6-210/216 slc173/slc173</i>
LY1160	<i>h+/h-</i>	<i>leu1-32/ leu1-32 ura4D18/ ura4D? ade6-210/216 slc71/slc71</i>
LY971	<i>h+/h-</i>	<i>leu1-32/ leu1-32 ura4D?/ ura4D? ade6-210/216 cut3-477/cut3-477</i>
LY993	<i>h+/h-</i>	<i>leu1-32/ leu1-32 ura4D?/ ura4D? ade6-210/216 cut3-477/cut3-477 slc85/ slc85+</i>
LY994	<i>h+/h-</i>	<i>leu1-32/ leu1-32 ura4D?/ ura4D? ade6-210/216 cut3-477/cut3-477 slc85/slc85</i>
LY1180	<i>h+/h-</i>	<i>leu1-32/ leu1-32 ura4D18/ ura4D18 ade6-210/216 cut3-477/cut3-477 slc71/slc85</i>

Figure 28

L113	<i>h-</i>	<i>leu1-32 ura4D18 ade6-210</i>
LY962	<i>h-</i>	<i>leu1-32 ura4D? ade6-216 slc129</i>
LY1244	<i>h-</i>	<i>leu1-32 ura4D? ade6-216 slc127</i>
LY1259	<i>h+</i>	<i>leu1-32 ade6-210 slc174</i>
LY1269	<i>h-</i>	<i>leu1-32 ura4D? ade6-210 slc185</i>

1.2 *E. Coli*

Le milieu LB (Luria Broth) a été utilisé pour les cultures bactériennes. Ce milieu peut également être sous forme solide par l'ajout d'agar et/ou complétement par de l'ampicilline à 100 µg/l.

2. Condition des cultures liquides

Les souches stockées à -80°C en YES+A 40% glycérol sont remises en croissance par striation sur milieu solide à température permissive jusqu'à apparition de colonies. La pré-culture est alorsensemencée à partir des colonies sur boîte dans une fiole d'Erlenmeyer d'une capacité au moins cinq fois supérieure au volume de culture, puis sont incubées sur la nuit à 32°C sous agitation constante de 200 rpm afin d'assurer une aération homogène du milieu. La culture estensemencée à partir de la pré-culture dans les mêmes conditions.

En milieu liquide, la phase exponentielle de croissance se situe entre 1.10^6 à 1.10^7 cellules/ml (Moreno, Klar, et Nurse 1991).

La densité cellulaire est estimée par comptage à l'aide d'une cellule de Thoma. Le temps de génération (1 cycle cellulaire) dure entre 2,5 et 5 heures suivant le génotype de la souche, la température et le milieu de culture. Les cultures sontensemencées à partir des pré-cultures de sorte à ce que les cellules soient cultivées en phase exponentielle.

3. Cultures des mutants *nda3-KM311*

Le gène *nda3* (nuclear division arrest) code la β -tubuline. La mutation *nda3-KM311* confère une cryosensibilité à 20°C et bloque la synthèse du fuseau mitotique. A température restrictive, les cellules mutantes *nda3-KM311* se bloquent en prophase – métaphase (Hiraoka, Toda, et Yanagida 1984).

En phase exponentielle, la majorité des cellules de *S. pombe* sont en phase G2. Lorsque la culture atteint 5.10^6 cellules/ml en YES+A à 32°C, elle est transférée dans un bain marie agitant à 17°C pendant 7 heures. L'arrêt des cellules en début de mitose est marqué par l'absence de cellules binucléées et l'absence de septum. La synchronisation des cellules est ensuite vérifiée au microscope par coloration au DAPI et calcofluor

Figure 29

L113 *h-* *leu1-32 ura4D18 ade6-210*
 LY1069 *h-* *leu1-32 ura4D18 cut3-477*

Figure 30

L113 *h-* *leu1-32 ura4D18 ade6-210*
 LY854 *h-* *leu1-32 ura4D? ade6-216 slc47*
 LY1242 *h-* *leu1-32 ura4D? ade6-210 slc127*
 LY962 *h-* *leu1-32 ura4D? ade6-216 slc129*

Figure 31

LY1153 *h-* *leu1-32 uraD? cut3-gfp-ura4+ sid4-Tomato-HygroR*
 LY1154 *h?* *leu1-32 ura4D? slc173 cut3-gfp-ura4+ sid4-Tomato-HygroR*
 LY1150 *h-* *leu1-32 ura4D? slc47 cut3-gfp-ura4+ sid4-Tomato-HygroR*

Figure 32

L113 *h-* *leu1-32 ura4D18 ade6-210*
 LY1069 *h-* *leu1-32 ura4D18 cut3-477*
 LY852 *h-* *leu1-32 ura4D? ade6-210 cut3-477 slc47*
 LY1292 *h-* *leu1-32 ura4D ? ade6-210 gcn5Δ::kanR*

 LY664 *h+/h-* *leu1-32/ leu1-32 ura4D18/ura4D18 ade6-210/216*
 LY971 *h+/h-* *leu1-32/ leu1-32 ura4D?/ ura4D? ade6-210/216 cut3-477/cut3-477*
 LY986 *h+/h-* *leu1-32/ leu1-32 ura4D?/ ura4D? ade6-210/216 cut3-477/cut3-477 slc47/slc47*
 LY985 *h+/h-* *leu1-32/ leu1-32 ura4D?/ ura4D? ade6-210/216 cut3-477/cut3-477 slc47/slc47+*
 LY1329 *h+/h-* *leu1-32/leu1-32 ura4D?/ura4D? ade6-216/ade6-210 cut3-477/cut3-477 slc47/gcn5Δ::KanR*

Figure 33

L113 *h-* *leu1-32 ura4D18 ade6-210*
 LY1069 *h-* *leu1-32 ura4D18 cut3-477*
 LY854 *h-* *leu1-32 ura4D? ade6-216 slc47*
 LY852 *h-* *leu1-32 ura4D? ade6-210 cut3-477 slc47*
 LY1292 *h-* *leu1-32 ura4D ? ade6-210 gcn5Δ::kanR*
 LY1318 *h-* *leu1-32 ura4D? ade6-210cut3-477 gcn5Δ::kanR*
 LY2625 *h+* *leu1-32 ura4D18 ade6-210 arp9Δ::NatR*
 LY2709 *h?* *leu1-32 ura4D? cut3-477 arp9Δ::NatR*
 LY3078 *h+* *leu1-32 ura4D? ade6-210mga2Δ::KanR*
 LY3102 *h-* *leu1-32 ura4D? cut3-477 mga2Δ::KanR*
 LY1269 *h-* *leu1-32 ura4D? ade6-210 slc185*
 LY1011 *h-* *leu1-32 ura4D? ade6-210 slc185 cut3-477*
 LY2602 *h-* *leu1-32 ura4D? ulp2Δ::NatR*
 LY? *h-* *leu1-32 ura4D? ulp2Δ::NatR cut3-477*

ou par la présence de signaux GFP enrichis dans le noyau pour les souches *cnd2-GFP* (*Cnd2-GFP* utilisé ici comme marqueur mitotique). A t=7h à 17°C, on compte entre 70% et 80% de la population cellulaire synchronisée en mitose.

B. Méthode génétique

1. Mutagenèse aléatoire à l'Ethyle Methane Sulfonate (Fait par P.B et X. R)

Les cellules *pREP41-cut3⁺ cut3-477* cultivées en phase exponentielle de croissance en milieu synthétique dépourvu de thiamine ont été incubées en présence d'EMS 2% (v/v) – Ethyl Methane Sulphonate - pendant 3 heures à 30°C (~1 génération). Les cellules ont été lavées six fois avec 1 ml d'une solution NaCl 0,9% (w/v), cultivées 6 heures en milieu synthétique sans thiamine à 30°C, reprises dans une solution de PMG 40% (v/v) glycérol et stockées à -80°C.

L'enrichissement en mutations a été estimé en étalant des aliquotes traitées à l'EMS et non traitées sur milieu complet contenant une dose létale de bénomyl (inhibiteur de polymérisation des microtubules). La fréquence d'apparition des colonies mutantes, résistantes au bénomyl était 100 à 150 fois supérieure pour l'échantillon traité à l'EMS comparé au contrôle non traité. Avec un taux de mutations spontanées de 10^{-6} par gène, le taux de mutations induites par traitement à l'EMS serait de l'ordre de 10^{-4} par gène.

2. Test en gouttes (TEG)

Les cellules sont cultivées en milieu liquide en phase exponentielle de croissance ou resuspendues dans H₂Oq stérile à partir de souches fraîchement striées sur milieu solide, puis diluées en série au 1/5^e et déposées en gouttes sur milieu solide. La première goutte contient 3000 cellules.

3. Croisement

Un croisement se fait par le mélange de deux souches de signes opposées (h^+ et h^-) sur un milieu synthétique carencé en azote (SPA). Dans ces conditions, les cellules h^+ et h^- vont conjuguer pour entrer en méiose pour donner des asques à 4 spores ordonnées. Dès 48 heures à 28 ou 30°C, les asques et les spores peuvent être visibles sous le

LY1259	<i>h+</i>	<i>leu1-32 ade6-210 slc174</i>
LY1005	<i>h+</i>	<i>leu1-32 ade6-216 slc174 cut3-477</i>
LY2601	<i>h+</i>	<i>leu1-32 ura4D18 ade6-216 cph2Δ::NatR</i>
LY2745	<i>h-</i>	<i>leu1-32 ura4D18 cut3-477 cph2Δ::NatR</i>

Figure 34

L113	<i>h-</i>	<i>leu1-32 ura4D18 ade6-210</i>
LY1069	<i>h-</i>	<i>leu1-32 ura4D18 cut3-477</i>
LY846	<i>h-</i>	<i>leu1-32 ura4D? ade6-216sup122</i>
LY840	<i>h-</i>	<i>leu1-32 ura4D? ade6-210cut3-477 sup122</i>
LY971	<i>h+/h-</i>	<i>leu1-32/ leu1-32 ura4D?/ura4D? ade6-210/216 cut3-477/cut3-477</i>
LY972	<i>h+/h-</i>	<i>leu1-32/ leu1-32 ura4D?/ura4D? ade6-210/216 cut3-477/cut3-477 sup122/sup122+</i>
LY973	<i>h+/h-</i>	<i>leu1-32/ leu1-32 ura4D?/ura4D? ade6-210/216 cut3-477/cut3-477 sup122/sup122</i>
LY28	<i>h-</i>	<i>leu1-32 ura4D18 ade6-210 pcs1Δ::ura4+</i>
LY688	<i>h-</i>	<i>leu1-32 ura4D18 ade6-216 rad3Δ::ura4+</i>
LY392	<i>h-</i>	<i>leu1-32 ura4D18 ade6-210 his3D1 pht1Δ::natR</i>
LY981	<i>h+</i>	<i>leu1-32 ura4D18 cut3-477 sup122 pht1Δ::NatR</i>

Figure 35

L113	<i>h-</i>	<i>leu1-32 ura4D18 ade6-210</i>
LY1069	<i>h-</i>	<i>leu1-32 ura4D18 cut3-477</i>
LY846	<i>h-</i>	<i>leu1-32 ura4D? ade6-216sup122</i>
LY840	<i>h-</i>	<i>leu1-32 ura4D? ade6-210cut3-477 sup122</i>

Figure 38

L113	<i>h-</i>	<i>leu1-32 ura4D18 ade6-210</i>
LY1069	<i>h-</i>	<i>leu1-32 ura4D18 cut3-477</i>
LY854	<i>h-</i>	<i>leu1-32 ura4D? ade6-216 slc47</i>
LY852	<i>h-</i>	<i>leu1-32 ura4D? ade6-210 cut3-477 slc47</i>
LY1292	<i>h-</i>	<i>leu1-32 ura4D ? ade6-210 gcn5Δ::kanR</i>
LY1318	<i>h-</i>	<i>leu1-32 ura4D? ade6-210cut3-477 gcn5Δ::kanR</i>

Figure 39

L113	<i>h-</i>	<i>leu1-32 ura4D18 ade6-210</i>
LY1139	<i>h+</i>	<i>leu1-32 ura4D? cdc11-GFP-KanR mis6-3HA-LEU2</i>
LY1354	<i>h?</i>	<i>leu1-32 ura4D? cut3-477 cdc11-GFP-KanR mis6-3HA-LEU2</i>
LY1357	<i>h-</i>	<i>leu1-32 ura4D? slc47 cdc11-GFP-KanR mis6-3HA-LEU2</i>
LY1942	<i>h-</i>	<i>leu1-32 ura4D ? slc47 cdc11-gfp-KanR pREP-fib1-RFP-LEU2</i>
LY1938	<i>h-</i>	<i>leu1-32 ura4D ? cut3-477 cdc11-gfp-KanR pREP-fib1-RFP-LEU2</i>

Figure 40

L113	<i>h-</i>	<i>leu1-32 ura4D18 ade6-210</i>
LY854	<i>h-</i>	<i>leu1-32 ura4D? ade6-216 slc47</i>
LY1292	<i>h-</i>	<i>leu1-32 ura4D ? ade6-210 gcn5Δ::kanR</i>
LY395	<i>h-</i>	<i>leu1-32 ura4D? cut3-GFP-ura4+</i>

microscope la présence de spore, riche en amidon, peut être révélée par une coloration à la vapeur d'iode l'iode (violet/noir si positif).

3.1 Analyses des spores en vrac

1/10^e du croisement est traité à la cytohélicase 0,5% (v/v en H₂O) pendant quelques heures à 32°C sous agitation. Cette réaction enzymatique détruit les cellules végétatives et libère les spores des asques. La lyse des cellules végétatives est complétée par l'ajout de SDS 1% final (w/v). La densité des spores est déterminée par comptage à la cellule de Thoma et les spores sont étalées sur le milieu solide.

3.2 Analyses de tétrades

Les asques issus d'un croisement sont striés sur milieu solide et ils sont déposés de façon isolée à l'aide d'un micromanipulateur. Après 2 à 3 heures d'incubation à la température du croisement, la paroi des asques se rompt. Les 4 spores contenues dans chaque asque sont semées de façon ordonnée. Les boîtes sont incubées à température appropriée jusqu'à apparition des colonies.

4. Isolement de souches diploïdes

Les cellules haploïdes mutantes *ade6-210* ou *ade6-216* sont auxotrophes pour l'adénine et développent une coloration rouge ou orangée, respectivement, sur milieu limitant en adénine. Cette coloration est due à l'accumulation d'un précurseur dans la voie de biosynthèse de l'adénine. L'isolement de souches diploïdes repose sur la complémentation intragénique entre les allèles *ade6-210* et *ade6-216*, qui restaure la prototrophie pour l'adénine (colonies blanches sur milieu limitant en adénine) (Forsburg et Rhind 2006). Les souches haploïdes *ade6-210* et *ade6-216* de signes sexuels opposés (h⁺ et h⁻) sont mélangées sur SPA. Après 16/18h à 25/32°C, le mélange est strié sur milieu PMG dépourvu d'adénine (PMG-A) où seules les cellules diploïdes pourront croître.

LY710	<i>h-</i>	<i>leu1-32 ura4D? ade6-210slc47cut3-GFP-ura4+</i>
LY1436	<i>h-</i>	<i>leu1-32 ura4D gcn5Δ::KanR cut3-GFP-ura4+ sid4-tomato-hygroR</i>
LY47	<i>h-</i>	<i>leu1-32 cut14-3HA-His6-ura4+</i>
LY2108	<i>h-</i>	<i>leu1-32 ura4D? ade6? slc47 cut14-HA-His6-ura4+ dam1-gfp-kanR</i>
LY2086	<i>h-</i>	<i>leu1-32 ura4D? gcn5Δ::NatR cut14-HA-His6-ura4+ dam1-gfp-kanR</i>
LY2341	<i>h+</i>	<i>leu1-32 ura4D? top2-HA-ura4+ dam1-gfp-KanMX6</i>
LY2342	<i>h+</i>	<i>leu1-32 ura4D? slc47 top2-HA-ura4+ dam1-gfp-KanMX6</i>
LY2343	<i>h+</i>	<i>leu1-32 ura4D? gcn5Δ::NatR top2-HA-ura4+ dam1-gfp-KanMX6</i>
LY1069	<i>h-</i>	<i>leu1-32 ura4D18 cut3-477</i>
LY852	<i>h-</i>	<i>leu1-32 ura4D? ade6-210 cut3-477 slc47</i>
LY1640	<i>h-</i>	<i>leu1-32 ura4D? ars1-FYG146.021-abp2cnp3-LEU2 slc47</i>
LY1664	<i>h-</i>	<i>leu1-32 ura4D? ade6-210ars1-FYG146.021-abp2cnp3-LEU2 cut3-477</i>
LY1669	<i>h-</i>	<i>leu1-32 ura4D? ars1-FYG146.021-abp2cnp3-LEU2 cut3-477 slc47</i>
LY270	<i>h-</i>	<i>leu1-32 ura4D18 nda3-KM311</i>
LY388	<i>h-</i>	<i>leu1-32 ura4D? nda3-KM311 cut3-HA-His6-ura4+ cnd2-GFP-LEU2</i>
LY348	<i>h+</i>	<i>leu1-32 ura4D? nda3-KM311 cut3-3HA-His6-ura4+</i>
LY1798	<i>h-</i>	<i>leu1-32 ura4D? nda3-KM311 gcn5Δ::KanR cut3-HA-His6-ura4+</i>
LY1799	<i>h+</i>	<i>leu1-32 ura4D? nda3-KM311 gcn5Δ::KanR cut3-HA-His6-ura4+ cnd2-gfp-LEU2</i>

Figure 41

L113	<i>h-</i>	<i>leu1-32 ura4D18 ade6-210</i>
LY1069	<i>h-</i>	<i>leu1-32 ura4D18 cut3-477</i>
LY1292	<i>h-</i>	<i>leu1-32 ura4D ? ade6-210 gcn5Δ::kanR</i>
LY1318	<i>h-</i>	<i>leu1-32 ura4D? ade6-210cut3-477 gcn5Δ::kanR</i>
LY1490 <small>A.Verdel</small>	<i>h+</i>	<i>leu1-32 ura4D? sgf11Δ::KanR</i>
LY1518	<i>h-</i>	<i>leu1-32 ura4D? cut3-477 sgf11Δ::KanR</i>
LY1491 <small>A.Verdel</small>	<i>h+</i>	<i>leu1-32 ura4D ? ada2Δ::KanR</i>
LY1519	<i>h-</i>	<i>leu1-32 ura4D? cut3-477 ada2Δ::KanR</i>
LY1492 <small>A.Verdel</small>	<i>h+</i>	<i>leu1-32 ura4D ? ngg1Δ::KanR</i>
LY1520	<i>h-</i>	<i>leu1-32 ura4D? cut3-477 ngg1Δ::KanR</i>
LY1658 <small>FWP314</small>	<i>h+</i>	<i>ura4D18 ade6-216 spt8Δ::ura4+</i>
LY1698	<i>h?</i>	<i>leu1-32 ura4D? ade6-210cut3-477 spt8Δ::ura4+</i>
LY1659 <small>FWP342</small>	<i>h+</i>	<i>ura4D18 ade6-216 gcn5-myc13-NatR</i>
LY1788	<i>h?</i>	<i>leu1-32 ura4D? ade6-216cut3-477 gcn5-myc13-natR</i>
LY1660 <small>FWP343</small>	<i>h+</i>	<i>ura4D18 ade6-216 gcn5-191-myc13-NatR</i>
LY1786	<i>h-</i>	<i>leu1-32 ura4D? ade6-216cut3-477 gcn5-191-myc13-natR</i>
LY1694 <small>bioneer version 2 10H6</small>	<i>h+</i>	<i>leu1-32 ura4D?-ade6-210 hat1Δ::KanR</i>
LY1741	<i>h-</i>	<i>leu1-32 ura4D? cut3-477 hat1Δ::KanR</i>
LY1695 <small>bioneer version 2 22E4</small>	<i>h+</i>	<i>leu1-32 ura4D ? ade6-210 naa40Δ::KanR</i>
LY1743	<i>h-</i>	<i>leu1-32 ura4D? cut3-477 naa40Δ::KanR</i>
LY1635 <small>FY1890</small>	<i>h+</i>	<i>leu1-32 ura418 ade6-210mst2Δ::ura4+</i>
LY1686	<i>h+</i>	<i>leu1-32 ura4D? mst2Δ::ura4+ cut3-477</i>
LY1682	<i>h90</i>	<i>leu1-32 ura4D? his3D1 arg3D4 rrt109Δ::KanR</i>
LY1726	<i>h-</i>	<i>leu1-32 ura4D? cut3-477 rrt109Δ::KanR</i>
LY1785	<i>h?</i>	<i>elp3Δ::KanR</i>

C. Techniques de génétique et biologie moléculaire

1. Transformation de *S. pombe*

Les cellules sont mises en culture pour atteindre une densité cellulaire entre 8.10^6 et 1.10^7 cellules/ml. Les cellules sont centrifugées pendant 3 min à 3000 rpm, transférées dans un Eppendorf, et lavées deux fois dans 1 ml de lithium acétate 0,1 M pH 4,9. Les cellules sont ensuite resuspendues de façon à obtenir 10^9 cellules/ml en lithium acétate et aliquotées par 150 μ L. Chaque aliquot est incubé à 32°C pendant 1 h. L'ADN (environ 1 μ g d'ADN) est ajouté dans un volume inférieur ou égal à 15 μ l en TE pH 7,5 (10 mM Tris-HCL, 1 mM EDTA, pH 7,5), les tubes sont brièvement vortexés pour homogénéiser la suspension cellulaire et 370 μ l de TE-PEG (50% w/v) préchauffé à 32°C sont rajoutés. Le tout est vortexé pendant 30 secondes, puis les cellules sont incubées pendant 45 min à 32°C. Après ce délai, un choc thermique est réalisé à 46°C pendant 15 min, les tubes sont ensuite laissés 10 min à température ambiante puis centrifugés pendant 5 secondes à pleine vitesse. Les cellules sont resuspendues dans 500 μ l de YES+A, puis des parties aliquotes de la suspension cellulaire sont étalées sur des boîtes YES+A à 32°C sur la nuit. Le lendemain, les colonies sont répliquées sur milieu sélectif. Les colonies transformées apparaissent généralement après 3-4 jours d'incubation.

Intégration d'un plasmide dans le génome de S. pombe. Chez *S. pombe*, l'intégration par recombinaison homologue est plus fréquente que par recombinaison non-homologue (5 à 10% des évènements d'intégration). Une coupure unique dans l'ADN génomique porté par le plasmide augmente environ 10 fois la fréquence d'intégration au locus (vraisemblablement en activant le système de réparation au locus). Après avoir transformé les cellules avec un plasmide réplcatif rendu linéaire par coupure unique dans la région d'intérêt, les souches transformées de façon stable sont sélectionnées de la façon suivante. Environ 50 colonies transformées sont repiquées sur milieu sélectif. Après 2 jours d'incubation à 32°C, les colonies sont répliquées sur milieu non sélectif afin de permettre la croissance des cellules ayant perdu le plasmide. Les boîtes sont incubées à 32°C jusqu'à apparition de colonies isolées et trois à six d'entre elles sont testées pour la présence du plasmide par repiquage sur milieux sélectifs et non sélectifs. Si le plasmide est intégré dans le génome alors toutes les colonies repiquées

LY1778	<i>h?</i>	<i>cut3-477 elp3Δ::KanR</i>
LY1499	<i>h-</i>	<i>leu1-32 eso1-H17</i>
LY1530	<i>h-</i>	<i>leu1-32 eso1-H17 gcn5Δ::KanR sid4-Tomato-HygroR</i>
LY1559	<i>h-</i>	<i>leu1-32 slc47 eso1-H17 sid4-Tomato-HygroR</i>
LY1562	<i>h+</i>	<i>leu1-32 ura4D? ade6-216rad21-K1-ura4+</i>
LY1544	<i>h-</i>	<i>leu1-32 ura4D? ade6-216rad21-K1-ura4+ gcn5Δ::KanR sid4-Tomato-HygroR</i>
LY1564	<i>h-</i>	<i>leu1-32 ura4D? ade6-216slc47 rad21-K1-ura4+ sid4-Tomato-HygroR</i>

Figure 42

L113	<i>h-</i>	<i>leu1-32 ura4D18 ade6-210</i>
LY1069	<i>h-</i>	<i>leu1-32 ura4D18 cut3-477</i>
LY656	<i>h-</i>	<i>leu1-32 ura4D18 ade6-216 cut14-208ts</i>
LY1292	<i>h-</i>	<i>leu1-32 ura4D ? ade6-210 gcn5Δ::kanR</i>
LY1318	<i>h-</i>	<i>leu1-32 ura4D? ade6-210cut3-477 gcn5Δ::kanR</i>
LY1336	<i>h-</i>	<i>leu1-32 ura4D? ade6-210cut14-208 gcn5Δ::KanR</i>
LY1250	<i>h-</i>	<i>leu1-32 uraD? ade6-210 slc179</i>
LY1581	<i>h-</i>	<i>leu1-32 ura4D? ade6-210slc179 gcn5Δ::KanR</i>
LY1268	<i>h-</i>	<i>leu1-32 ura4D? ade6-210slc184-3</i>
LY1547	<i>h?</i>	<i>leu1-32 ura4D? ade6-210slc184-gcn5Δ::KanR</i>
LY43	<i>h-</i>	<i>leu1-32 ura4D18 top2-250</i>
LY28	<i>h-</i>	<i>leu1-32 ura4D18 ade6-210 pcs1Δ::ura4+</i>
LY2190	<i>h-</i>	<i>leu1-32 ura4D? ade6-210gcn5Δ::KanR pcs1Δ::ura4+</i>

Figure 43

LY1842	<i>h-</i>	<i>leu1-32 ura4D18 ade6-210 dam1-gfp-KanMX6</i>
LY2672	<i>h-</i>	<i>leu1-32 ura4D? cut3-HA-kanMX6 dam1-gfp::Hph</i>
LY2795	<i>h-</i>	<i>leu1-32 uraD ? gcn5Δ::NatR cut3-HA-KanMX6 dam1-gfp::Hph</i>
LY2791	<i>h90</i>	<i>leu1-32 uraD ? mst2Δ::ura4+ gcn5Δ::NatR cut3-HA-KanMX6 dam1-gfp::Hph</i>
LY3387	<i>h?</i>	<i>leu1-32 ura4D ? gcn5Δ::NatR mst2Δ::ura4+ dam1-gfp-Hph</i>
LY2340	<i>h-</i>	<i>leu1-32 ura4D? top2-HA-ura4+ dam1-gfp-KanMX6</i>
LY3388	<i>h?</i>	<i>leu1-32 ura4D ? gcn5Δ::NatR mst2Δ::ura4+ top2-HA-ura4+ dam1-gfp-Hph</i>
LY2344 -	<i>h+</i>	<i>leu1-32 ura4D? cut3-477 top2-HA-ura4+ dam1-gfp-KanMX6</i>

Figure 44

LY270	<i>h-</i>	<i>leu1-32 ura4D18 nda3-KM311</i>
LY3201	<i>h+</i>	<i>leu1-32 ura4D ? nda3-KM311 gcn5Δ::NatR mst2::ura</i>
LY1802	<i>h-</i>	<i>leu1-32 ura4D? nda3-KM311 cnd2-gfp-LEU2</i>
LY1349	<i>h-</i>	<i>leu1-32 ura4D? ade6-210nda3-KM311 gcn5Δ::KanR cnd2-gfp-LEU2</i>
LY3200	<i>h-</i>	<i>leu1-32 ura4D ? nda3-KM311 gcn5Δ::NatR mst2::ura+ cnd2-gfp-LEU2</i>

Figure 45

L113	<i>h-</i>	<i>leu1-32 ura4D18 ade6-210</i>
LY1804	<i>h+</i>	<i>leu1-32 ura4D? ade6-216cut3Δ::ura4+-cut3K348R-LEU2</i>
LY1805	<i>h+</i>	<i>leu1-32 ura4D? ade6-216cut3Δ::ura4+-cut3K1069R-LEU2</i>
LY1806	<i>h+</i>	<i>leu1-32 ura4D? ade6-210cut3Δ::ura4+-cut3KR2-LEU2</i>

doivent croître sur milieu sélectif après plusieurs générations en absence de pression de sélection.

2. Transformation de *E. Coli*

Entre 50 et 100 ng de solution d'ADN sont ajoutés à 40 µl de bactéries électrocompétentes. Le mélange est transféré dans une cuve à électroporation préalablement refroidie dans la glace. L'électroporation est effectuée à 18 kV (entre 4 et 5 ms), les bactéries sont ensuite immédiatement reprises dans 1 ml de LB préchauffé à 37°C puis incubées 30 min à 37°C (temps du délai d'expression phénotypique). Les bactéries transformées sont étalées aux billes sur milieu solide LB-Amp (ampicilline 100 µg/ml) à 37°C sur la nuit.

3. Préparation d'ADN

3.1 Extraction d'ADN génomique de *S. pombe*

A partir d'une culture de 20 ml de 1.10^7 cellules/ml ou de colonies fraîches sur boîtes (racler la moitié de la boîte) resuspendues dans 500 µl d'eau millipore, les cellules sont centrifugées puis resuspendues dans un 200 µl de tampon de lyse (2% v/v triton X-100, 1% w/v SDS, 100mM NaCl, 10mM Tris-HCl pH8, 1mM EDTA pH8). Un volume de billes de verres (glass beads- acid washed -Sigma) est ajouté à la suspension cellulaire avec 200 µl de phénol chloroforme isoamyl alcohol 25 :24 :1. Le tout est vortexé durant 4 à 5 min, puis centrifugé pendant 5 min à 14,5 krpm. La phase aqueuse est transférée dans un nouveau tube, l'ADN est alors précipité à l'éthanol absolu pendant 15 min sur la roue 40 rpm et culotté par centrifugation de 2 min à 15 rpm. Le culot d'ADN est rincé à l'éthanol 70% puis resuspendu dans 400 µl de TE 0,1 mg/ml RNase A. Le tout est incubé 5-15 min à 37°C. L'ADN est à nouveau précipité par ajout de Na-acétate pH 5,2 150mM final et 1 ml d'éthanol absolu. Après centrifugation de 2 min à 15 krpm, le culot est séché 5-10 min à 65°C et enfin resuspendu dans 50 µl de TE pH8.

Figure 46

LY2110	<i>h+</i>	<i>leu1-32 ura4D? ade6-216 cut14D::NatR-LEU2-cut14</i>
LY2122	<i>h-</i>	<i>leu1-32 ura4D? ade6-216 cut3-477 cut14D::NatR-LEU2-cut14</i>
LY2213	<i>h+</i>	<i>leu1-32 ura4D18 ade6-216 cut14Δ::NatR-LEU2-cut14K114R</i>
LY2219	<i>h-</i>	<i>leu1-32 ura4D18 cut3-477 cut14Δ::NatR-LEU2-cut14K114R</i>
LY2214	<i>h+</i>	<i>leu1-32 ura4D18 ade6-216 cut14Δ::NatR-LEU2-cut14K114Q</i>
LY2231	<i>h-</i>	<i>leu1-32 ura4D18 cut3-477 cut14Δ::NatR-LEU2-cut14K114Q</i>
L113	<i>h-</i>	<i>leu1-32 ura4D18 ade6-210</i>
LY1292	<i>h-</i>	<i>leu1-32 ura4D ? ade6-210 gcn5Δ::kanR</i>

Figure 47

L113	<i>h-</i>	<i>leu1-32 ura4D18 ade6-210</i>
LY1418 _{FY6079}	<i>h-</i>	<i>leu1-32 ura4D? ade6-210his3D1 arg3D4 H3.2-K14R H3.1/H4.1Δ::his3+ H3.3/H4.3Δ::arg3+ otr1R(sphI)::ade6+</i>
LY1419 _{FY4780}	<i>h-</i>	<i>leu1-32 ura4D? ade6-210his3D1 arg3D4 H3.2-S10A H3.1/H4.1Δ::his3+ H3.3/H4.3Δ::arg3+ otr1R(sphI)::ade6+</i>
LY1375 _{SPBX61}	<i>h-</i>	<i>leu1-32 ura4D18 ade6-210 his3D1 arg3D4 H3K4R H3.1/H4.1::his3+ H3.3/H4.3Δ::arg3+otr1R(sphI)::ade6+</i>
LY1416 _{FY6072}	<i>h-</i>	<i>leu1-32? Ura4? ade6-210 his3D1? arg3D4?H3.2 K9R H3.1/H4.1Δ::his3+ H3.3/H4.3Δ::arg3+ otr1R(sphI)::ade6+</i>
LY1455	<i>h-</i>	<i>leu1-32 ura4D? ade6-210arg3D4 his3D1 cut3-477 H3.2-K14R H3.1/H4.1Δ::his3+ H3.3/H4.3Δ::arg3+ otr1R(sphI)::ade6+</i>
LY1458	<i>h-</i>	<i>leu1-32 ura4D? ade6-210/216 arg3D4 his3D1 cut3-477 H3-S10A H3.1/H4.1Δ::his3+ H3.3/H4.3Δ::arg3+ otr1R(sphI)::ade6+</i>
LY1459	<i>h-</i>	<i>leu1-32 ura4D? ade6-210arg3D4 his3D1 cut3-477 H3-K4R H3.1/H4.1Δ::his3+ H3.3/H4.3Δ::arg3+ otr1R(sphI)::ade6+</i>
LY1462	<i>h-</i>	<i>leu1-32 ura4D? ade6-210 arg3D4 his3D1 cut3-477 H3.2-K9R H3.1/H4.1Δ::his3+ H3.3/H4.3Δ::arg3+ otr1R(sphI)::ade6+</i>
LY1069	<i>h-</i>	<i>leu1-32 ura4D18 cut3-477</i>
LY2332	<i>h-</i>	<i>leu1-32 ura4D? ade6-210 swi6Δ::ura4+</i>
LY2334	<i>h-</i>	<i>leu1-32 ura4D? ade6-210 cut3-477 swi6Δ::ura4+</i>
LY1292	<i>h-</i>	<i>leu1-32 ura4D ? ade6-210 gcn5Δ::kanR</i>
LY1318	<i>h-</i>	<i>leu1-32 ura4D? ade6-210cut3-477 gcn5Δ::kanR</i>
LY2752	<i>h-</i>	<i>leu1-32 ura4D? cut3-477 clr3Δ::KanR gcn5Δ::NatR</i>
LY2755	<i>h-</i>	<i>leu1-32 ura4D? cut3-477 hos2Δ::KanR gcn5Δ::NatR</i>
LY2757	<i>h-</i>	<i>leu1-32 cut3-477 hos2Δ::KanR</i>
LY2753	<i>h90</i>	<i>leu1-32 ura4D? Acut3-477clr3Δ::KanR</i>
LY1376 _{SPBX12}	<i>h-</i>	<i>leu1-32 ura4D18 ade6-210 his3D1 arg3D4 H3.2/H4.2-ura4+ H3.1/H4.1Δ::his3+ H3.3/H4.3Δ::arg3+ otr1R(sphI)::ade6+</i>
LY3370 _{FY6078}	<i>h?</i>	<i>leu1-32 ura4D- ade6-210 his-arg3- H3.1/H4.1Δ::his3+ H3.3/H4.3Δ::arg3+ H3.2K9R-K14R otr1R(sphI)::ade6+</i>
LY3407	<i>h+</i>	<i>leu1-32 ura4D- ade6-210 his-arg3- H3.1/H4.1Δ::his3+ H3.3/H4.3Δ::arg3+ H3.2-ura4+ otr1R(sphI)::ade6+ cnd2-gfp-LEU2</i>
LY3417	<i>h?</i>	<i>leu1-32 ura4D- ade6-210 his-arg3- H3.1/H4.1Δ::his3+ H3.3/H4.3Δ::arg3+ H3.2K9R-K14R otr1R(sphI)::ade6+ cnd2-gfp-LEU2</i>

3.2 Extraction plasmidique à partir de *E. coli*

Minipréparation. Les bactéries sont cultivées sur la nuit dans 2 ml de milieu LB-Amp (100 µg/ml). Le Kit *EZ-10 spin column plasmid DNA Minipreps* commercialisé par Bio Basic Inc. est utilisé pour l'extraction plasmidique.

Midipréparation. Les bactéries sont cultivées sur la nuit dans 50 ml de milieu LB-Amp (100 µg/ml). Le système *Wizard Plus Midipreps DNA purification System* commercialisé par Promega est utilisé pour l'extraction plasmidique.

4. Préparation des ARNs

Les cellules sont récoltées à partir de cultures en phase exponentielle de croissance ($5 \cdot 10^6$ - $1 \cdot 10^7$ cellules par ml) en YES+A afin d'obtenir $2 \cdot 10^8$ cellules par échantillon. Le culot de cellules est alors congelé à l'azote liquide puis conservé à -80°C .

4.1 Extraction des ARNs

Les cellules sont décongelées sur la glace, et resuspendues dans 1 ml d'eau millipore « RNase free » froide. Après centrifugation de 30 sec 13 krpm, le surnageant est éliminé, les cellules sont reprises dans 500 µl de tampon TE10S (10 mM Tris pH 7,5, 10 mM EDTA pH 8, 0,5% SDS) et 500 µl de phénol : chloroforme 5:1, acide (pH 5,1) réfrigéré, est rajouté. Le tout est vortexé 10 sec puis incubé à 65°C pendant 1 h (vortexé 10 sec toutes les 10 min). Les tubes sont replacés à 4°C quelques minutes puis centrifugés 10 min 15 krpm afin de récupérer la phase aqueuse. Après une seconde extraction phénol-chloroforme acide et une extraction au chloroforme, l'ARN est précipité par ajout de NaCl 300 mM et l'ajout de 750 µl d'éthanol absolu. Le tout est vigoureusement vortexé puis incubé à -80°C pendant 30 min puis l'ARN est culotté par centrifugation de 20 min à 14 krpm. Le culot est ensuite rincé à l'éthanol 70%, puis séché à 32°C . L'ARN est resuspendu dans 100 µl de TE pH7,5. Les ARNs sont dosés au spectrophotomètre DO 260 et la concentration finale est autour de 2-4 µg/µl d'ARN total.

Figure 48

LY2052	<i>h-</i>	<i>leu1-32 ura4D? cnd2-pk9-Hph dam1-gfp-kanR</i>
LY2083	<i>h-</i>	<i>leu1-32 ura4D? ade6-210gcn5Δ::NatR cnd2-pk9-Hph dam1-gfp-kanR</i>
LY2674	<i>h+</i>	<i>leu1-32 ura- ade6-216dam1-gfp::Hph</i>
LY3387	<i>h?</i>	<i>leu1-32 ura4D ? gcn5Δ::NatR mst2Δ::ura4+ dam1-gfp-HygroR</i>

Figure 50

LY1802	<i>h-</i>	<i>leu1-32 ura4D? nda3-KM311 cnd2-gfp-LEU2</i>
LY1349	<i>h-</i>	<i>leu1-32 ura4D? ade6-210nda3-KM311 gcn5Δ::KanR cnd2-gfp-LEU2</i>
LY3200	<i>h-</i>	<i>leu1-32 ura4D ? nda3-KM311 gcn5Δ::NatR mst2::ura+ cnd2-gfp-LEU2</i>

Figure 51

L113	<i>h-</i>	<i>leu1-32 ura4D18 ade6-210</i>
LY3070	<i>h-</i>	<i>leu1-32 ura4D18 ade6-210 his3D1 arg3D4 dam1-gfp-HygroR snf22-HA-KanR</i>
LY3086	<i>h-</i>	<i>leu1-32 ura4- ade6- his3D1 arg3D4 dam1-gfp-HygroR arp9-HA-KanR</i>

Figure 52

L113	<i>h-</i>	<i>leu1-32 ura4D18 ade6-210</i>
LY2052	<i>h-</i>	<i>leu1-32 ura4D? cnd2-pk9-Hph dam1-gfp-kanR</i>
LY2080	<i>h-</i>	<i>leu1-32 ura4D? cut3-477 cnd2-pk9-Hph dam1-gfp-kanR</i>
LY ?	<i>h-</i>	<i>leu1-32 ura4D? slc127 cnd2-pk9-Hph dam1-gfp-kanR</i>

ura4D? correspond à l'allèle *ura4D18* ou *ura4D/E*

4.2 Digestion des ARNs

20 µg d'ARN sont digérés avec le kit *Turbo DNA free* commercialisé par Ambion. La digestion est vérifiée en migrant 2 µg d'ARN digérés sur gel d'agarose 1% en vis à vis avec 2 µg d'ARN non digéré. On observe deux bandes d'ARN ribosomiques, distinctes, net et sans bavure, avec un ratio grande/petite bande proche de 2 :1.

4.3 Reverse Transcription

La synthèse des ADN complémentaires (ADNc) est réalisée, à partir de 500 ng d'ARN digéré par le kit *Turbo DNA free*, en utilisant le kit *RT First Strand synthesis using oligodT* commercialisé par Life Technologies (Invitrogen).

4.4 Détermination du niveau d'expression d'un gène d'intérêt

Les PCR quantitatives (qPCR) sont effectuées sur les ARNs ayant été traités à la RT (ADNc) en des sites spécifiques. Les résultats de ces qPCRs sont alors comparés à d'autres effectuées sur les ARNs non-traités afin de déterminer le niveau d'expression des sites étudiés.

L'enzyme utilisée est le SYBR Green commercialisée par Qiagen. La machine utilisée est le *rotor gene Q* de Qiagen. Les résultats sont analysés à l'aide du logiciel *rotor gene Q series*, puis traités sur excel pour la normalisation (par rapport à act 1) et le montage des graphiques.

5. Mutagenèse dirigée pour construire des souches *cut14* non acétylables ou constitutivement acétylée et des souches *cut3* non acétylables

Nous avons construit un produit PCR où la partie de 5'UTR et une partie de l'ORF (open reading frame) de *cut14* est remplacée par la cassette KAN (kanamycine). La première étape a été de construire un diploïde *cut14Δ::NatR/cut14⁺* en transformant un diploïde wt par le produit PCR. Parallèlement, j'ai cloné le gène *cut14* dans le plasmide *pREP-41XL-LEU2* (ligation ratio PCR *cut14*/vecteur 3 :1).

Des mutagenèses dirigées ont été réalisées sur le plasmide *pREP-41XL-cut14-LEU2* à l'aide du kit *QuikChange II Site Directed Mutagenesis* commercialisé par Agilent Technologies avec des amorces spécifiques à la construction du *pREP-41XL-cut14K114R-LEU2* et à celle du *pREP-41XL-cut14K114Q-LEU2*. Le diploïde *cut14Δ::NatR/cut14+* a été transformé avec par les plasmides *pREP-41XL-cut14-LEU2*, *pREP-41XL-cut14K114R-LEU2* et *pREP-41XL-cut14K114Q-LEU2* linéarisés au niveau de *cut14*. Après sporulation des transformants diploïdes, les haploïdes *cut14Δ::NatR pREP-41XL-cut14-LEU2*, *cut14Δ::NatR pREP-41XL-cut14K114R-LEU2* et *cut14Δ::NatR pREP-41XL-cut14K114Q-LEU2* ont été sélectionnées.

Les souches *cut3* non acétylables ont été construites par le même principe (*cut3* est également un gène essentiel). Seule la synthèse des gènes a été confiée à la plateforme de séquençages (Grenoble). Les souches haploïdes obtenues sont *cut3Δ::ura4 pREP-41XL-cut3-LEU2*, *cut3Δ::ura4 pREP-41XL-cut14K348R-LEU2*, *cut3Δ::ura4 pREP-41XL-cut14K1069Q-LEU2* et *cut3Δ::ura4 pREP-41XL-cut14K348R-K1069Q-LEU2*.

D. Analyse des protéines

Les cellules sont récoltées en PMSF 1 mM final en PBS à partir d'une culture de 20 ml en phase de croissance exponentielle (5.10^6 - 1.10^7 cellules par ml) en YES+A. Le culot de cellules est alors congelé dans l'azote liquide puis conservé à -80°C.

1. Extraction en condition dénaturante

Les culots de cellules sont pesés et les cellules sont resuspendues dans du Sample Buffer SB (62,5 mM Tris pH 6,8 , 5% SDS, 10% glycérol, 5% β mercapto, 0,01% bromophenol blue, 1 pastille de protéase EDTA free Roche (1 pour 10 ml)) en proportion 1 :3 (pour 1 mg ajouter 3 μl de SB). Un volume de billes de verres (glass beads- acid washed -Sigma) est ajouté à la suspension cellulaire. Les cellules sont cassées pendant 30 secondes à 6,5 m/s à l'aide d'un *CryoFastPrep®-24* commercialisé par MP Biomedicals. Le lysat est récupéré, clarifié et bouilli à 95°C pendant 5- 10 min. Les échantillons sont prêts pour être chargés sur un gel d'électrophorèse et peuvent être conservés à -20°C.

2. Immunoprécipitation (IP)

Le système Miltenyi a été utilisé pour les immunoprécipitations à raison de 50 µl de billes magnétique µMACS couplées à la protéine G par échantillon. L'anticorps utilisé est un anti Gfp roche (ref 11814460001) à raison de 5 µl par IP.

2.1 Extraction de protéines en version native

L'immunoprécipitation est réalisée sur 2.10^8 cellules. Les cellules décongelées sont reprises dans 125 µl de tampon de lyse froid (50 mM Hepes pH7,6, 75 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 1 mM EGTA, 1 mM DTT, 0,1% Triton X-100, 10% glycérol, 10mM Sodium Butyrate, 1 pastille de protéase EDTA free Roche (1 pour 10 ml)). Un volume de billes de verres (acid washed -Sigma) est ajouté au mélange cellules-tampon. Les cellules sont cassées à l'aide d'un *CryoFastPrep®-24* (MP biomedical) : 2 fois 20 secondes à 6,5 m/s. Le lysat est récupéré dans de nouveaux tubes et 275 µl de tampon de lyse froid. Le tout est clarifié 2 fois 5 min (14 000 rpm/ 4°C). Les extraits totaux sont prêts pour l'immunoprécipitation, un aliquot est conservé pour être migré sur gel d'électrophorèse. Les échantillons peuvent être dosés via la technique de Bradford.

2.2 Immunoprécipitation sur les lysats clarifiés

A partir du lysat clarifié, 50 µl de billes µMACS préalablement équilibrées dans le tampon de lyse sont ajoutées ainsi que 5 µl anti-GFP. Le tout est incubé une heure dans la glace à l'abri de la lumière. Les colonnes µMACS sont positionnées sur le portoir magnétique puis équilibrées par du tampon de lyse. Le lysat est passé sur la colonne. Les billes magnétiques et les complexes immuns associés sont retenus dans la colonne. La fraction non retenue par la colonne est conservée. Cinq lavages de 200 µl de tampon de lyses sans inhibiteur sont effectués. Enfin 20 µl de sample buffer (SB) (62,5mM Tris pH6,8 , 5% SDS, 10% glycérol, 5% β mercapto, 0,01% bromophenol blue, 1 pastille d'inhibiteurs de protéases EDTA free Roche (1 pour 10 ml)) préchauffé à 95°C est ajouté (volume mort). Après 5 min d'incubation, 50 µl de SB sont ajoutés afin de récupérer 50 µl de fraction éluée constituant l'IP.

3. Co-immunoprécipitation (Co-IP)

3.1 Récoltes des culture

Les cellules sont récoltées en PMSF 1mM final de façon à obtenir 2 aliquots de $2,5 \cdot 10^8$ cellules par échantillon à partir de culture en phase exponentielle de croissance (synchrones ou asynchrones) puis congelées en azote liquide et stockées à -80°C .

3.2 Lyse cellulaire

Les cellules sont décongelées sur la glace puis resuspendues dans 100 μl de tampon HB (100 mM MOPS, 500 mM MgCl_2 , 150 mM EGTA, 0,1% triton X100, 300 mM DTT, 600 mM β glycérol, 100 mM NO, 100 mM NaF, 300 mM PN, 500 mM NaButyrate, 100 mM PMSF, 1 pastille d'inhibiteurs de protéases EDTA free Roche (1 pour 10 ml)). On ajoute un volume de billes de verres (acid washed -Sigma) au mélange. Les cellules sont cassées à l'aide d'un *CryoFastPrep®-24* (MP biomedical) : 2 fois 30 secondes à 6,5 m/s. Le lysat est conservé après 2 clarifications de 5 min (14 krpm/ 4°C), et un ré-équilibre du volume à 400 μl en tampon.

3.3 Préparation des billes

Après remise en suspension des billes sur la roue, un volume de 30 μl est prélevé par immunoprécipitation (IP), 2 tubes pour 2 échantillons de la même souche. Elles sont lavées 3 fois dans 500 μl de tampon HB, puis reprises dans leur volume initial. L'anticorps est ensuite ajouté : 4 $\mu\text{g}/\text{IP}$ d'anti GFP (A11122 life technologies) pour le ChiP condensine. Le mixte billes-AC est incubé 1 h sur la roue 30 rpm, à 4°C .

3.4 Co-immunoprécipitation sur les lysats clarifiés

A partir du lysat clarifié, 50 μl constitueront l'extrait total et le reste subira l'immunoprécipitation. Aux 350 μl restants sont ajoutés 30 μl de billes-Ac. Le tout est incubé sur la roue à 4°C pendant une heure sur la roue 30 rpm. Après l'incubation, 50 μl

de surnageant sont prélevés pour constituer la partie non retenue (FT) et les billes sont lavées 3 fois par le tampon HB. Les billes sont ensuite reprises dans 50 µl de sample buffer (SB) (62,5 mM Tris pH6,8 , 5% SDS, 10% glycérol, 5% β mercaptoéthanol, 0,01% bromophenol blue, 1 pastille d'inhibiteurs de protéases EDTA free Roche (1 pour 10 ml)) et mises à 95°C pendant 5 min. Les IP sont recoltées dans de nouveaux tubes et peuvent être conservées à -20°C.

4. Western blot

4.1 Electrophorèse des protéines

Les protéines sont séparées selon leur masse moléculaire par électrophorèse en gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes. L'électrophorèse est réalisée avec un appareil « Miniprotean II » de Bio-Rad. Le gel de polyacrylamide en plaque mince (épaisseur 1,5 mm) est composé d'un gel de séparation homogène contenant 7,5 à 12,5% de polyacrylamide au sommet duquel est coulé un gel de concentration de 1 à 2 cm de hauteur contenant 5,2% de polyacrylamide. La composition des gels est indiquée ci-dessous

	<i>Gel de séparation</i>			<i>Gel de concentration</i>
Acrylamide	7,5%	10%	12,5%	5,2%
Bisacrylamide	0,17%	0,13%	0,1%	0,14%
Tris-HCl pH8,8	375mM	375mM	375mM	130mM pH6,8
SDS	0,1%	0,1%	0,1%	-
APS	0,1%	0,1%	0,1%	0,1%
TEMED	0,1%	0,1%	0,1%	0,1%

Les échantillons protéiques sont déposés dans les puits. L'électrophorèse est réalisée en tampon de migration (25 mM Tris, 250 mM Glycine, 0,1% w/v SDS) pendant 30 à 45 min à voltage constant (200 volts).

4.2 Transfert des protéines sur membrane

Ici, le transfert des protéines du gel sur la membrane (membrane nitrocellulose – Amersham) se fait par transfert électrique semi sec. Le gel démoulé est plongé dans un bain de tampon de transfert (25 mM tris, 190 mM glycine, 20% éthanol, 3,7% SDS) pendant 5 min. De la cathode vers l'anode, le montage est le suivant : 3 papiers Wathman, la membrane, le gel, 3 papiers Wathman, le tout préalablement humidifié dans le tampon de transfert. Le courant appliqué entre les pôles (+ et -) est de 0,8 mA par cm² de gel, soit environ 40 mA pendant une heure.

4.3 Immunoblot

Application de l'anticorps primaire. Après transfert sur membrane de nitrocellulose (Amersham), il est possible par marquage au ponceau de vérifier l'efficacité du transfert. La membrane est ensuite rincée à l'eau distillée puis est saturée dans du lait 5% TBST (TBST : 20 mM tris, 137 mM NaCl, 0,1% tween-20) sur plateau agitant 20 rpm à température ambiante. Après 30 min d'incubation, la membrane est incubée dans l'anticorps primaire dilué dans du lait 5% TBST pour la nuit à 4°C sous agitation douce. Les anticorps utilisés sont listés dans le tableau.

<i>anti gfp</i>	monoclonal de souris (roche - anti gfp 11814460001- 0,4mg/ml)	1/1000
	polyclonal de lapin (life technologies -A11122-2mg/ml)	1/1000
<i>anti HA</i>	monoclonal de souris (roche- 12CA5- 0,4mg/ml)	1/1000
<i>anti tat1</i>	monoclonal de souris anti-alpha-tubuline	1/800

Application de l'anticorps secondaire. Cette étape consiste à révéler l'anticorps primaire par un anticorps secondaire couplé à une protéine HRP (horseradish peroxidase). Le lendemain, la membrane subit 3 bains de lavage en TBST, 10 min à température ambiante. La membrane est ensuite incubée dans l'anticorps secondaire dilué dans le lait 5% TBST pendant 45 min sur plateau agitant, suivi de 3 lavages en TBST (10 min sur plateau agitant).

<i>anti-souris-HRP</i> (Sigma A7282)	1/10 000
<i>anti-lapin-HRP</i> (E Healthcare NA9340)	1/10 000

Révélation-Développement. L'activité peroxidase issue du substrat HRP couplé à l'anticorps secondaire est détectée par traitement de la membrane avec le kit *SuperSignal™ West Femto Chemiluminescent Substrate* pour les protéines peu abondantes ou par le kit *SuperSignal™ West Pico Chemiluminescent Substrate* pour les protéines abondantes (kits commercialisés par Thermo Scientific). Le tout est révélé par une développeuse de films en chambre noire.

E. Protéines associés à la chromatine

Ici, deux méthodes complémentaires sont utilisées, une approche pan-génomique avec l'immunofluorescence sur étalement de la chromatine permettant de mesurer l'association d'une protéine à la chromatine en mesurant l'intensité de fluorescence sur l'ensemble des chromosomes et une approche région-spécifique par ChIP permettant de mesurer l'association d'une protéine à la chromatine en une ou des région(s) d'ADN bien spécifiques (de l'ordre des paires de base).

1. Immufluorescence sur étalement de la chromatine

1.1 Préparation des sphéroplastes

Digestion des parois. Les cultures de cellules en phase exponentielle de croissance sont arrêtées par ajout d'azide de sodium à 1 mM final et incubées pendant 5 min. $5 \cdot 10^7$ cellules sont récoltées après lavage en eau millipore PMSF 1mM. Les culots cellulaires sont repris dans 900 μ l de sorbitol 1,2 M froid. La paroi des cellules est lysée à l'enzyme « Lysing Enzymes from *Trichoderma harzianum* (Sigma) » à 6,7 mg/ml en SP2 (1,2M sorbitol, 50 mM Tri-sodium citrate, 450 mM Na₂HPO₄, pH 5,6). Après 30 min d'incubation à 37°C, la lyse est vérifiée au microscope sur 2 μ l de cellules traitées au SDS (2 μ l de SDS 1%). Lorsqu'elle atteint 90%, l'activité de l'enzyme est stoppée l'ajout de 3 μ l de Tris-HCl 1 M pH 7,5 dans la glace.

Lavages des sphéroplastes. Sous les sphéroplastes sont ajoutés 1 ml de coussin de saccharose 15% froid (15% w/v sucrose, 1,2 M sorbitol, 10 mM Tris-HCl, pH 7,5). Après

deux centrifugations de 2 min à 4000 g à 4°C (entre les 2, changement de l'orientation des tubes), deux lavages se succèdent par resuspension des sphéroplastes dans 1 ml de deux solutions de lavage différentes (1- solution de Sorbitol/Tris froid : 1,2 M sorbitol, 10 mM Tris-HCl, pH 7,5 2- solution de Sorbitol/MES froid: 100 mM MES hydrate, 1 mM EDTA, 0,5 mM MgCl₂, 1 M sorbitol, pH 6,4). Le culot est resuspendu dans 400 µl de Sorbitol/MES froid.

1.2 Etalement de la chromatine

L'étalement de la chromatine se fait sur des lames de microscopie Superfrost®, Menzel-Gläser, par défaut la chromatine colle au verre. L'étalement se fait en simultanée avec la lyse complète des sphéroplastes (membranes plasmidique et nucléaire) sous l'action de détergent et la fixation des liaisons entre protéines et ADN de manière covalente (pontages). Sur la lame sont déposés de façon successive 20 µl de la suspension de sphéroplastes, 40 µl fixateur (3,4% saccharose, 1,89% pFA), 80 µl de Lipsol 1,5% et à nouveau 80 µl d'une solution de fixateur. Le tout est étalé sur la lame à l'aide d'une pipette Pasteur utilisé comme « rouleau à pâtisserie ». Les lames doivent être complètement sèches avant toute utilisation ou stockage à 4°C (temps minimum 4 h).

1.3 Immunofluorescence indirecte sur la chromatine étalée sur une lame de verre.

Les étalements de chromosomes fixés sur les lames sont réhydratés et lavés dans 3 bains de PBS (136,9 mM NaCl, 2,68 mM KCl, 8,1 mM Na₂HPO₄, 1,47 mM KH₂PO₄, pH 7,2) de 10 min sur agitation douce (plateau 20 rpm). Les lames sont saturées par ajout de 100 µl d'une solution de blocage (25 mg BSA, 385 µl de gélatine de poisson 13%, en PBS, le tout filtré 0,45 µm) entre lame et lamelle.

Application de l'anticorps primaire. Après l'étape de blocage, la lamelle est retirée et l'excédant de liquide est drainé sur du papier Wathman. Une solution d'anticorps primaire(s) dilué dans la solution de blocage est déposée sur la lame (100 µl), et le tout est recouvert d'une lamelle. L'anticorps primaire incube sur les lames 2 h à température ambiante sous agitation douce (plateau agitant 20 rpm).

- anti GFP:* polyclonal de lapin (A11122-2µg/µl- life technologies-2mg/ml)
 monoclonal de souris (JL-8 Living colors- clontech-1mg/ml).
 Ici ils permettent de visualiser la protéine Dam1-gfp. Dam1 est une protéine des kinétochores, utilisée comme marquage mitotique. L'anticorps A11122 est utilisé au 1/800 et le JL-8 au 1/500
- anti V5-TAG PK9:* monoclonal de souris clone SV5-Pk1 (AbD serotec- 1µg/µl). Ici il permet de visualiser la protéine Cnd2-PK9. Cnd2 est sous unité régulatrice du complexe condensine. L'anticorps est utilisé au 1/500.
- anti HA :* monoclonal souris (12CA5). Ici il permet de visualiser les protéines Top2-HA et Cut3-HA. Top2 code la topoisomérase II et Cut3 est une sous unité SMC de condensine. L'anticorps est utilisé au 1/800.
- anti- H3 Ct :* polyclonal de lapin (Abcam, ab1791- 0,5mg/ml). L'anticorps est utilisé au 1/200.
- anti- H3K9ac :* polyclonal de lapin (Abcam, ab12179- 2,3mg/ml). L'anticorps est utilisé au 1/200.
- anti cnd2* polyclonal lapin anti Cnd2. (B-Bridge #63-105) L'anticorps est utilisé au 1/500
- anti-MPM2* monoclonal souris anti MPM2 (Millipore #05-368). L'anticorps est utilisé au 1/10000

Application de l'anticorps secondaire. Cette étape consiste à révéler l'anticorps primaire par un anticorps secondaire couplé à un fluorochrome (FITC ou Cy3 cf Cytologie-immunofluorescence indirecte). Le FITC (fluoresceine isothiocyanate) est un fluorochrome dont la longueur d'onde d'excitation est 495 nm et la longueur d'onde d'émission 525 nm (vert). Le Cy3 est un fluorochrome dont la longueur d'onde d'excitation est de 550 nm et la longueur d'onde d'émission est de 570 nm (rouge).
 La lamelle est retirée, la lame est soumise à 3 bains de lavages en PBS de 10 min, l'excédant de liquide est drainé par du papier Wathman. Une solution d'anticorps secondaire(s) dilué dans la solution de blocage est déposée sur la lame (100 µl), et le tout est recouvert d'une lamelle. L'anticorps primaire incube sur les lames sur la nuit à 4°C sous agitation douce (plateau agitant 20 rpm). Les lames sont placées dans une chambre humide obscure afin que la lame ne colle pas à la lamelle.

<i>Anti-mouse FITC</i> (SIGMA F2883)	1/400
<i>Anti-mouse CY3</i> (SIGMA C2181)	1/400
<i>Anti-rabbit FITC</i> (SIGMA F0382)	1/400
<i>Anti-rabbit CY3</i> (SIGMA C2306)	1/400
<i>Anti-mouse-Alexa 488 (FITC)</i> (life technologies A11017 -2 mg/ml)	1/500

1.4 Coloration de l'ADN au DAPI et montage des lames

Le DAPI (4', 6'-diamino-2 phénylindole dihydrochloride) colore l'ADN en se fixant préférentiellement dans les petits sillons de la double hélice avec une préférence pour les séquences riches en base A+T (Jeppesen et Nielsen 1989).

La lamelle est retirée de la lame et la lame est soumise à 3 bains de lavages en PBS de 10 min. L'excès de liquide sur du papier absorbant est drainé complètement. 50 µl de milieu de montage (0,3 µl DAPI 100 µg/ml, 150 µl de solution de blocage, 300 µl d'antifading Vectashield) sont déposés sur la lame puis recouverts délicatement d'une lamelle. Les bords sont séchés avec du papier absorbant puis scellés au vernis ongle.

1.5 Détections et quantifications de la fluorescence des protéines associées à la chromatine

Les images ont été collectées avec le microscope à fluorescence AxioImager (objectif 63X) piloté par le logiciel Metamorph. Pour chaque longueur d'onde, des empilements de 8-10 images espacées de 0,2 µm en Z ont été acquis. L'acquisition se fait au format 12 bit, sans autoscale (4096 niveaux de gris allant de noir à blanc). La gamme linéaire de la caméra CCD est située entre 0 et 3000. Pour chaque filtre, on détermine la durée d'exposition permettant d'obtenir un signal max proche de 2000. Les réglages d'acquisition se font sur les noyaux sauvages, pour chaque longueur d'onde et ces réglages seront sauvegardés sur les trois réplicats. Sont listés ci-dessous les différentes conditions d'acquisitions en fonction des protéines observées et AC utilisés.

Cnd2-Pk9 (Cy3)	Dam1-gfp (FITC)	=> Cy 3 : 500 ms, GFP : 700ms, DAPI : 400ms
Top2-HA (Cy3)	Dam1-gfp (FITC)	=> Cy 3 : 500 ms, GFP : 500ms, DAPI : 300ms
Cut3-HA (Cy3)	Dam1-gfp (FITC)	=> Cy 3 : 1000 ms, GFP : 800ms, DAPI : 500ms
H3K9ac (Cy3)	Dam1-gfp (FITC)	=> Cy 3 : 800 ms, GFP : 200ms, DAPI : 100ms
H3Ct (Cy3)	Dam1-gfp (FITC)	=> Cy 3 : 500 ms, GFP : 500ms, DAPI : 100ms
MPM2(Cy3)	Cnd2-gfp (FITC)	=> Cy 3 : 300 ms, GFP : 200ms, DAPI : 200ms
Cnd2(Cy3)	Dam1-gfp (FITC)	=> Cy 3 : 300 ms, GFP : 200ms, DAPI : 100ms

L'intensité des signaux Dam1 en GFP est utilisée comme marqueur mitotique de manière qualitative, les noyaux présentant un ou deux spots de GFP sont en mitoses, les noyaux sans spot sont en interphase. L'intensité des signaux Cy3 (correspondant aux protéines d'intérêts) est mesurée sur un carré de surface constante (70x70 pixels) contenant le

noyau mitotique ou non mitotique. Le bruit de fond du signal de fluorescence est mesuré sur un carré d'une zone adjacente et sans noyau. Le signal correspondant au bruit de fond est soustrait pour chaque noyau. L'intensité des signaux est mesurée sur 30 à 60 noyaux mitotiques et 50-100 noyaux interphasiques par échantillon.

Pour comparer les résultats d'expériences indépendantes, les données ont été normalisées en prenant comme référence la valeur de la médiane du wt des noyaux mitotiques.

2. Immunoprécipitation de chromatine (ChIP)

2.1 Fixation et Récoltes des cellules

Les cellules sont cette fois-ci fixées au paraformaldéhyde dans le but de créer des pontages (liaisons covalentes) entre protéines et ADN. Les cellules sont cultivées en phase exponentielle de croissance à 32°C (synchrones ou asynchrones), et sont fixées par ajout de 1/10^e de fixateur (50 mM Tris pH 8, 11% formaldéhyde, 1 mM EDTA pH 8, 0,5 mM EGTA pH 8, 100mM NaCl) 5 min à 32°C puis 25°C à 17°C. Dans le cas de cellules arrêtées *nda3-KM311*, les cellules sont fixées 30 min à 17°C (Bernard et al. 2010). Après les 30 min de fixations les cellules sont récoltées après 2 lavages en PBS froid (136,9 mM NaCl, 2,68 mM KCl, 8,1 mM Na₂HPO₄, 1,47 mM KH₂PO₄, pH 7,2) de façon à obtenir 2.10⁸ cellules par échantillon. Le culot cellulaire est ensuite congelé en azote liquide puis stocké au -80°C.

2.2 Préparation de la chromatine

Les cellules sont décongelées sur la glace et toutes les manipulations sont réalisées dans sur la glace. La lyse des cellules est réalisée dans 400 µl de tampon de lyse (50 mM Hepes-KOH pH 7,5, 140 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% v/v Triton X-100, 0,1 % w/v sodium deoxycholate, 1mM PMSF), un volume de billes de verre (acid washed sigma) et à l'aide du *CryoFrostPrep* (MP Bio), 6 fois 1 min à 6,5 m/s. La lyse est vérifiée au microscope et le lysat est récolté dans de nouveaux tubes, et le volume est réajusté au tampon de lyse à 500 µl final. La chromatine est alors fragmentée (sonication) à l'aide du Diagenode Bioruptor préalablement refroidi (3°C) pendant 10 cycles 30 s ON/ 30 s OFF à vitesse

maximale. Le lysat est ensuite clarifié par 2 centrifugations, 1 fois 10 min et 1 fois 5 min 14 krpm 4°C.

2.3 Préparation des billes magnétiques dynabeads

Après remise en suspension sur la roue des billes, un volume de 15 µl est prélevé par immunoprécipitation (IP). Elles sont lavées 3 fois dans 500 µl de tampon d'IP (20 mM Tris-HCl pH 8, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA pH 8, 1% v/v triton X-100), puis reprises dans ce tampon dans 5 fois leur volume initial moins le volume de l'anticorps (AC). L'anticorps est ensuite ajouté : 4 µg/IP d'anti GFP (A11122 life technologies) pour le ChiP condensine, 2 µl/IP d'anti H3Ct (abcam ab1791) et 2 µl/IP d'anti H3K9ac (millipore 07-352) 2 µl/IP d'anti H3K14ac (millipore #06-911) 2 µl/IP d'anti H3K18ac (millipore #07-354) pour les ChIP H3. Le mixte billes-AC est incubé 40 min sur la roue 30 rpm, à température ambiante. Les billes-AC subissent 2 lavages de 500 µl de tampon d'IP et sont reprises dans le volume initial.

2.4 Les Immuprécipitations (IP)

A partir de la chromatine clarifiée (environ 500 µl), 70 µl sont utilisés pour la vérification de la sonication (shearing), 2 X 30 µl sont conservés à 4°C pour constituer la partie de l'extraction totale et 300 µl seront traités pour l'immunoprécipitation.

Shearing. Aux 70 µl sont ajoutés 112 µl de TE pH8 0,5% w/v SDS – 700 µg/ml protéine K (roche 10 mg/ml). Le tout est incubé à 65°C sur la nuit. Le lendemain, 320 µl de TE8 sont ajoutés. Une extraction au phénol/chloroforme/IAA est réalisée. L'ADN est ensuite précipité au NaCl 300 mM final et à l'éthanol. Le culot d'ADN est resuspendu dans 10 µl de TE8, RNase A 1 mg/ml final. Le tout est chargé sur gel d'agarose 2% en TBE 0,5X, puis migre 2 h 30 à 3 h à 50 V/cm.

IPs. Les IPs sont divisées en deux, 15 µl de billes-AC sont ajoutés aux 150 µl de chromatine clarifiée plus 150 µl de tampon de lyse. Les tubes sont incubés sur la roue 30 rpm à 4°C sur la nuit.

Le lendemain, les tubes sont placés sur le portoir aimanté et les IPs sont lavées dans 500 µl de tampons de lavages (1^e tampon de lavage : 20 mM Tris/HCl pH 8, 150

mM NaCl, 2 mM EDTA pH8, 1% v/v triton X-100 et 0,1% w/v SDS - 2^e tampon de lavage : 20 mM Tris/HCl pH 8, 300 mM NaCl, 2 mM EDTA pH8, 1% v/v triton X-100 et 0,1% w/v SDS - 3^e tampon de lavage: 10 mM Tris/HCl pH 8, 1mM EDTA pH8, 0,5% w/v déoxycholate, 1% v/v Igepal, 250 mM LiCl- 4^e et 5^e tampon : TE pH 8).

Pour les 3 premiers lavages, les tubes sont incubés 5 min sur la roue à 30 rpm à température ambiante, les 2 derniers sont réalisés sans étape d'incubation.

A chaque culot (complexe immun) sont ajoutés 130 µl de tampon d'élution (TE pH 8, 0,5% w/v SDS, 0,35 mg/ml protéinase K). Le tout est incubé 4 h à 65°C dans le but de reverser les pontages protéines/ADN. Après incubation, l'ADN est purifié sur colonne du kit *NucleoSpin Gel et PCR Clean-up* de Macherey Nagel.

Totaux. Les 60 µl sont également divisés en deux tubes de 30 µl et sont gardés à 4°C sur la nuit. Ils sont ensuite traités en même temps que les IPs : incubés pendant 4h à 65°C après l'ajout de 100 µl de tampon d'élution (TE pH8, 0,5% SDS, 0,35 mg/ml protéinase K) et l'extrait est purifié sur colonne du kit *NucleoSpin Gel et PCR Clean-up* de Macherey Nagel.

2.5 Détermination du pourcentage d'ADN immunoprécipité en des régions spécifiques

L'enzyme utilisée est le Syber Green commercialisée par Qiagen. La machine utilisée est le *rotor gene Q* de Qiagen. Les résultats sont analysés à l'aide du logiciel *rotor gene Q series*, puis traités sur Excel.

Les IPs et ADN totaux sont soumis à des PCR quantitatives en des sites (régions d'ADN) d'intérêts. Les régions testées sont indiquées dans le tableau. L'ADN est quantifié dans l'IP et le total à partir d'une gamme étalon.

Pour les ChIP condensines, le pourcentage d'ADN immunoprécipité est obtenu par
$$\left(\frac{\text{concentration de l'IP1}}{[\text{concentration ds le total1}] \times \text{facteur de dilution (5)}} \right) + \left(\frac{\text{concentration de l'IP2}}{[\text{concentration ds le total2}] \times \text{facteur de dilution (5)}} \right) / 2$$

Pour les ChIP H3Kac (ratio H3Kac/H3 Ct) :

$$\frac{((\text{concentration de l'IP H3Kac}) / [(\text{concentration ds le total1}) \times \text{facteur de dilution (5)}])}{((\text{concentration de l'IP H3 Ct}) / [(\text{concentration ds le total2}) \times \text{facteur de dilution (5)}])}$$

F. Analyses cytologiques

1. Immunofluorescence indirecte

1.1 Fixation des cellules au paraformaldéhyde(pFA)

Les cellules en phase exponentielle de croissance (2×10^6 à 1×10^7) sont fixées au formaldéhyde 3,7% (w/v) en présence de sorbitol 1,2 M pendant 45 minutes à température ambiante. Les cellules sont collectées par centrifugation et lavées 3 fois dans 1 ml de tampon PEMS (100 mM PIPES, 1 mM EGTA, 1 mM MgSO₄, 1,2 M Sorbitol, pH 6,9). Les cellules peuvent être alors conservées plusieurs semaines à 4°C.

1.2 Perméabilisation des cellules

La paroi est digérée par traitement à la zymolyase 100T (1 mg/ml en PEMS) pendant 90 minutes à 37°C. Les cellules sont reprises dans 0,5 ml de tampon PEMS 1% triton (v/v), incubées 5 minutes à température ambiante et lavées trois fois avec 0,25 ml de PEM (PEMS sans Sorbitol).

1.3 Immunofluorescence

Application de l'anticorps primaire. Les cellules ainsi perméabilisées sont incubées pendant 1 heure à température ambiante dans 0,5 ml de PEMBAL (PEM 1% w/v BSA, 10mM lysine hydrochloride). Elles sont ensuite reprises dans 0,1 ml d'une solution d'anticorps primaire diluée en PEMBAL et incubées à température ambiante sur la nuit.

anti Tat1 : monoclonal de souris anti-alpha-tubuline (Woods et al. 1989). Son utilisation en immunofluorescence indirecte permet de visualiser les microtubules qui forment le réseau interphasique et le fuseau mitotique. Il est utilisé à une dilution au 1/50.

anti-HA: monoclonal de souris (HA.7 – Sigma). Ici il permet de visualiser la protéine Mis6-HA, Mis 6-HA est une protéine centromérique. L'anticorps est utilisé au 1/500.

anti GFP: polyclonal de lapin (A11122- life technologies). Ici il permet de visualiser la protéine Cdc11-gfp. Cdc 11 est une protéine des SPB (spindle Pole Bodies) qui sont l'équivalent des centrosomes. L'anticorps est utilisé au 1/800.

Application de l'anticorps secondaire. Cette étape consiste à révéler l'anticorps primaire par un anticorps secondaire couplé à un fluorochrome. Le FITC (fluoresceine isothiocyanate) est un fluorochrome dont la longueur d'onde d'excitation est 495 nm et la longueur d'émission 525 nm (vert). Le Cy3 est un fluorochrome dont la longueur d'onde d'excitation est de 550 nm et la longueur d'émission est de 570 nm (rouge).

La suspension cellulaire est soumise à 3 lavages de 30 minutes dans 0,2 ml de PEMBAL. Les cellules sont reprises dans 0,1 ml d'anticorps secondaire dilué en PEMBAL incubées sur la roue pendant 2 h à température ambiante sur la roue 30 rpm. les cellules sont soumises à 3 lavages de 30 min, dans 0,15 ml de PEMBAL, 0,2 ml de PEM et 0,2 ml de PBS. Les cellules peuvent être à cette étape conservées à 4°C à l'obscurité.

<i>Anti-mouse-Alexa 488 (FITC)</i> (A11017-life technologies - 2 mg/ml)	1/400
<i>Anti-mouse Cy3</i> (Sigma C2181)	1/200
<i>Anti-rabbit FITC</i> (Sigma F0382)	1/200

1.4 Coloration de l'ADN au DAPI

Le DAPI (4', 6'-diamino-2 phénylindole dihydrochloride) colore l'ADN en se fixant préférentiellement dans les petits sillons de la double hélice avec une préférence pour les séquences riches en base A+T (Jeppesen et Nielsen 1989). Les cellules sont reprises dans 0,1 ml de DAPI 0,5 µg/ml en PBS et incubées 5 min à température ambiante à l'obscurité. Après quelques minutes, les cellules sont brièvement centrifugées et remises en suspension dans du PEM.

2. Fluorescence directe

Les cellules synthétisant des protéines fusionnées à la GFP, ou ses variants (Tomato), sont cultivées en milieux liquides en phase exponentielle de croissance. Les cellules subissent une fixation légère au formaldéhyde 1% (w/v) pendant 5 min, et, après deux

lavages en PBS, sont montées entre lame et lamelle en présence de 2µl d'une solution de DAPI 0,5 µg/ml en PBS.

3. Montage entre lame et lamelle

Les lamelles sont lavées au détergent, rincées à l'eau distillée, séchées puis recouvertes de poly-L-lysine. Le montage entre lame et lamelle se fait à l'aide de 5 µl de milieu de montage (anti-fading) déposés au centre de la préparation. Le tout est fixé à l'aide d'un vernis puis observation au microscope sinon le montage peut être conservé à 4°C à l'obscurité.

4. Microscopie

Les images ont été collectées avec le microscope à fluorescence AxioImager (objectif 63X) piloté par le logiciel Metamorph. Pour chaque longueur d'onde, des empilements de 8-10 images espacées de 0.2 µm en Z ont été acquis.

5. Analyse des images

Les longueurs des fuseaux mitotiques sont mesurées en utilisant le logiciel Image J. Les montages ont été réalisés en utilisant le logiciel Photoshop.

Chapitre III : Crible génétique pour des mutations synthétiquement létales avec *cut3-477*

À mon arrivée au laboratoire, un crible génétique pour des mutations synthétiquement létales avec *cut3-477* (*slc*) avait été initié par P. Bernard et X. Robellet dans le but d'identifier des facteurs de condensation mitotique des chromosomes chez la levure *S. pombe*. J'ai participé à la caractérisation et l'identification des mutations *slc*.

Nous avons isolés 17 mutants *slc* ainsi qu'un mutant suppresseur phénotypique de *cut3-477*. La répartition du travail s'est faite entre X. Robellet et moi. Je présente dans ce chapitre les 7 mutants sur lesquels j'ai principalement travaillé ainsi que les résultats que j'ai obtenus pour le suppresseur. Par soucis de cohérence et afin d'avoir une vision globale des résultats du crible, je présenterai également dans les tableaux récapitulatifs les résultats obtenus par X. Robellet. La publication relatant les résultats du crible dont je suis co-auteur avec X. Robellet est placée en fin du manuscrit (Robellet et al. 2014).

I- Principe

A. Principe de la coléthalité

La létalité synthétique affecte généralement des gènes redondants ou impliqués dans des processus distincts mais convergeant vers une même fonction cellulaire.

Le gène *top2* code la topo II (Top2) et *cut3*, la sous unité Cut3/Smc4 du complexe condensine I, chez *S. pombe*. La mutation cryosensible *top2-250* réduit l'activité catalytique de la topoisomérase II (Uemura et al. 1987). Cette mutation est synthétiquement létale avec la mutation thermosensible *cut3-477*. Le double mutant *top2-250 cut3-477* est mort à 30°C alors que les simples mutants sont viables à cette température (Saka et al. 1994). Cette coléthalité est vraisemblablement due au fait que la condensation des chromosomes n'est pas complètement effective à 30°C dans les fonds génétiques *cut3-477* ou *top2-250*. Ainsi, elle résulterait d'une interaction négative entre deux défauts modérés, non-létaux, de condensation. La souche *cut3-477* serait ainsi hypersensible à des mutations additionnelles, non létales qui altèreraient la condensation des chromosomes, à température permissive. Sur ce principe, la recherche

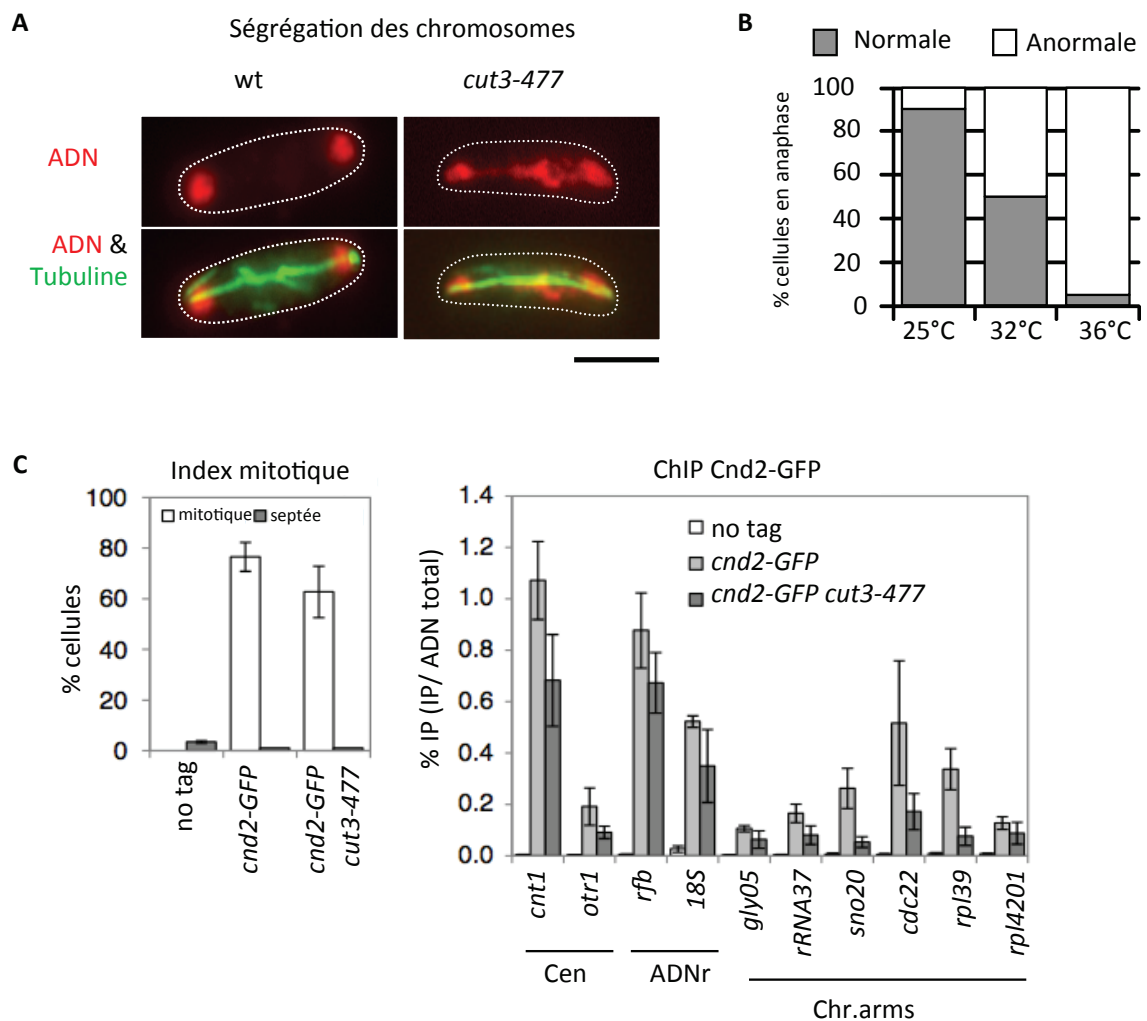


Figure 21 Caractérisation du mutant *cut3-477*.

A. Anaphases du mutant *cut3-477* par immunofluorescence indirecte de la tubuline (en vert). L'ADN est coloré par DAPI (en rouge). Le panneau de gauche correspond à une anaphase normale et celui de droite à une anaphase anormale où l'on observe un pont chromatinien. Barre : 5 microns **B.** Pourcentage d'anaphases présentant un défaut de ségrégation des chromosomes en fonction de la température chez les cellules mutantes *cut3-477*. **C.** Association de condensine (Cnd2-GFP) à la chromatine dans le mutant *cut3-477*. Les cellules ont été synchronisées en prométaphase par un arrêt *nda3-KM311*. Le % de cellules montrant un signal Cnd2-GFP nucléaire (mitotique) ou un septum (septée) Cet arrêt est validé par l'index mitotique (panneau de gauche) puis les cellules sont traitées pour une ChIP contre Cnd2-GFP (panneau de droite). Les valeurs indiquées correspondent aux moyennes et écart-moyens calculés à partir de 5 expériences indépendantes.

de mutations synthétiquement létales avec *cut3-477* devrait permettre l'identification de gènes nécessaires à la condensation des chromosomes.

B. Le mutant *cut3-477*

La mutation *cut3-477* est récessive et engendre une substitution de la sérine 1147 en proline (S1147P) dans la région C-terminale de Cut3, dans l'extrémité de la région *coiled coil* proximale du domaine ATPase. En règle générale, la proline entraîne une désorganisation des hélices alpha ; il est ainsi possible que la structure de la protéine Cut3-477 soit altérée. La mutation *cut3-477* confère une thermosensibilité de croissance à 36°C (Saka et al. 1994). Les mutants *cut3-477* présentent des défauts de condensation à 36°C mais ne montrent pas de défaut d'élongation du fuseau.

Afin de confirmer que la condensation des chromosomes n'est pas pleinement effective chez le simple mutant *cut3-477* à 32°C, P. Bernard a examiné la migration des chromosomes dans les cellules *cut3-477* cultivées à 32°C par une expérience d'immunofluorescence indirecte contre la tubuline suivie d'une coloration de l'ADN au DAPI. Les résultats ont montré la présence de ponts chromatiniens à 36°C mais également à 32°C et 25°C. Environ 90% des cellules en anaphase présentent des ponts chromatiniens à 36°C (Figure 21A-B). A cette température, la viabilité cellulaire diminue de 20 à 30% à chaque division cellulaire (Saka et al. 1994). A 32°C, les défauts de migration des chromosomes affectent 50% des anaphases, mais les cellules sont viables (Figure 21B). La présence de ponts chromatiniens à 32°C chez le mutant *cut3-477* suggère que l'activité condensine, et par conséquent la condensation mitotique des chromosomes, est partiellement altérée à cette température. La viabilité de la souche, suggère que les cellules *cut3-477* seraient capables de résoudre la plupart des défauts de migration des chromosomes avant la cytokinèse.

La condensation mitotique des chromosomes nécessite l'association du complexe condensine à la chromatine. Il est possible que les défauts observés dans les mutants *cut3-477* soit le résultat d'un défaut d'association de condensine. Afin d'adresser cette question, P. Legros et X. Robellet (AI et Post-doc) ont réalisé une immunoprécipitation de la chromatine (ChIP) à partir de cellules exprimant Cnd2-GFP (kleisine de condensine I) et synchronisées en prométaphase par un arrêt *nda3-KM311* de 7 heures à 17°C

(Figure 21C ; cf Chap II –IIA3 « Cultures des mutants *nda3-KM311* »). Dans les cellules *S. pombe*, la mitose est fermée (absence de rupture de la membrane nucléaire) et le complexe condensine, majoritairement cytoplasmique en interphase, est importé dans le noyau en début de mitose. Le signal Cnd2-GFP est majoritairement cytoplasmique en interphase et nucléaire en mitose (Sutani et al. 1999). L'import nucléaire de Cnd2-GFP a été évalué dans les cellules *cut3-477* bloquées en prométaphase en déterminant le pourcentage de cellules montrant un signal Cnd2-GFP nucléaire et la qualité de l'arrêt mitotique en mesurant le pourcentage de cellules septées (index de septation). Comme indiqué dans la Figure 21C, la souche *cut3-477* a montré une accumulation nucléaire de Cnd2-GFP et un index de septation similaires au contrôle sauvage. L'import nucléaire de Cnd2-GFP en mitose n'est donc pas manifestement altéré dans un fond génétique *cut3-477*. De plus, les cellules *nda3-KM311 cut3-477 cnd2-GFP* s'arrêtent efficacement en prométaphase à 17°C.

Les résultats de la ChIP montrent une diminution de l'association de Cnd2-GFP au niveau des centromères (*cen*), de l'ADN ribosomal (ADNr) et le long des bras de chromosome (Chr. arms) (Figure 21C). Ces résultats sont en accords avec ceux de Tada et al. (Tada et al. 2011), et suggèrent que la mutation *cut3-477* réduit l'association de condensine à la chromatine.

L'ensemble de ces données indique que le mutant *cut3-477* est viable à 32°C mais que l'association de condensine à la chromatine est réduite, et la migration des chromosomes altérée à cette température. Ces données sont cohérentes avec une défaillance partielle de condensation mitotique des chromosomes chez le mutant *cut3-477* à 32°C qui conférerait à la souche une hypersensibilité aux mutations additionnels affectant la condensation mitotique.

C. Le crible

Pour réaliser le crible génétique de létalité synthétique avec *cut3-477*, la souche testeuse *cut3-477 pREP41-cut3⁺* a été construite par P. Bernard (Figure 22A). Cette souche possède la mutation récessive *cut3-477* au locus *cut3*, plus un gène chimérique *pREP41-cut3⁺* inséré dans le génome en position ectopique. *pREP41* est une version atténuée du promoteur *nmt1* (no message in thiamine) dont l'activité est réprimée par la thiamine

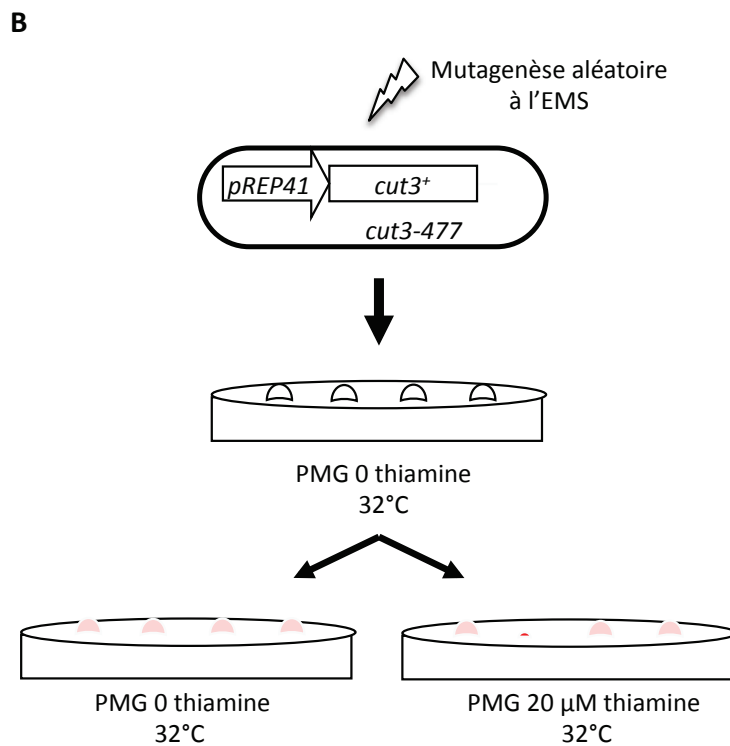
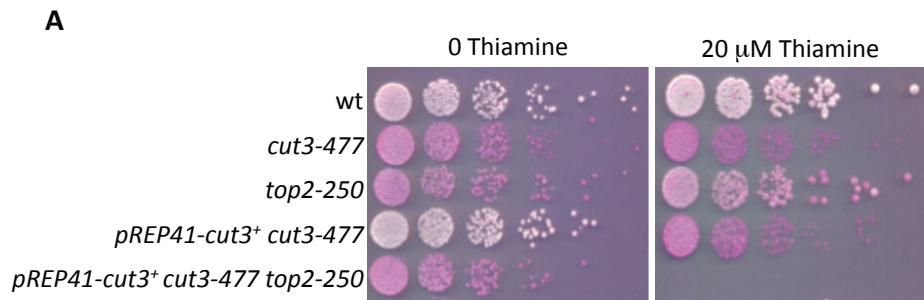


Figure 22 Principe du crible

A. La mutation *top2-250*, colétale avec *cut3-477* à 32°C, peut être maintenue dans la souche testeuse cultivée en l'absence de thiamine. Test en gouttes réalisé sur milieu solide PMG complétement avec la phloxine B, contenant ou non de la thiamine. **B.** Schéma explicatif du crible génétique de létalité synthétique avec *cut3-477*.

(vitamine B1). *S. pombe* est prototrophe pour la thiamine. En l'absence de thiamine dans le milieu de culture, le promoteur *nmt1* est actif (Basi, Schmid, et Maundrell 1993; Maundrell 1990; Maundrell 1993). En présence de thiamine (20 μ M), les cellules concentrent la vitamine, entraînant une répression du promoteur *nmt1*. Concernant la souche *cut3-477 pREP41-cut3⁺*, sur milieu PMG dépourvu de thiamine, le promoteur *pREP41* est actif; le gène *cut3⁺* est exprimé, complémente la mutation *cut3-477* et la souche se comporte comme une souche sauvage à 32°C (Figure 22A). En présence de thiamine, le promoteur *pREP41* est réprimé et la souche testeuse se comporte comme le mutant *cut3-477*.

Le crible a consisté en la recherche de mutants viables à 32°C sur milieu synthétique dépourvu de thiamine (PMG 0 Thi) lorsque condensine est pleinement fonctionnelle mais morts sur milieu synthétique supplémenté en thiamine (PMG 20 μ M Thi) lorsque condensine est partiellement altérée (Figure 22B). Une mutagenèse aléatoire à l'EMS a été réalisée sur la souche testeuse par P. Bernard (cf ChapII- IIB1 « Mutagenèse aléatoire à l'Ethyl Methane Sulfonate »). Les cellules mutées ont été étalées sur PMG en l'absence de thiamine à 32°C, et les colonies formées ont été répliquées sur milieu PMG sans thiamine ou supplémenté en thiamine (20 μ M) contenant de la phloxine B. La phloxine B est un colorant vital qui s'accumule dans les cellules malades ou mortes. Les colonies mutantes rose pâle (viables) sur PMG 0 Thi mais rouges foncées (mortes) sur PMG 20 μ M Thi ont été sélectionnés (Figure 22B).

II- Isolement des souches *slc*

A. Mutations non pertinentes attendues

Deux types de mutations non pertinentes étaient à anticiper : les mutations secondaires au locus *cut3-477*, invalidantes à 32°C (*cut3* est essentiel pour la viabilité cellulaire), et les mutations conférant une hypersensibilité à la thiamine. Ce bruit de fond a été éliminé par croisement retour avec une souche sauvage (*cut3⁺*). Les mutations secondaires au locus *cut3-477* ont été éliminées en recherchant la présence de colonies *cut3-477* viables à 32°C parmi les descendants. Les mutations d'hypersensibilité à la thiamine ont été

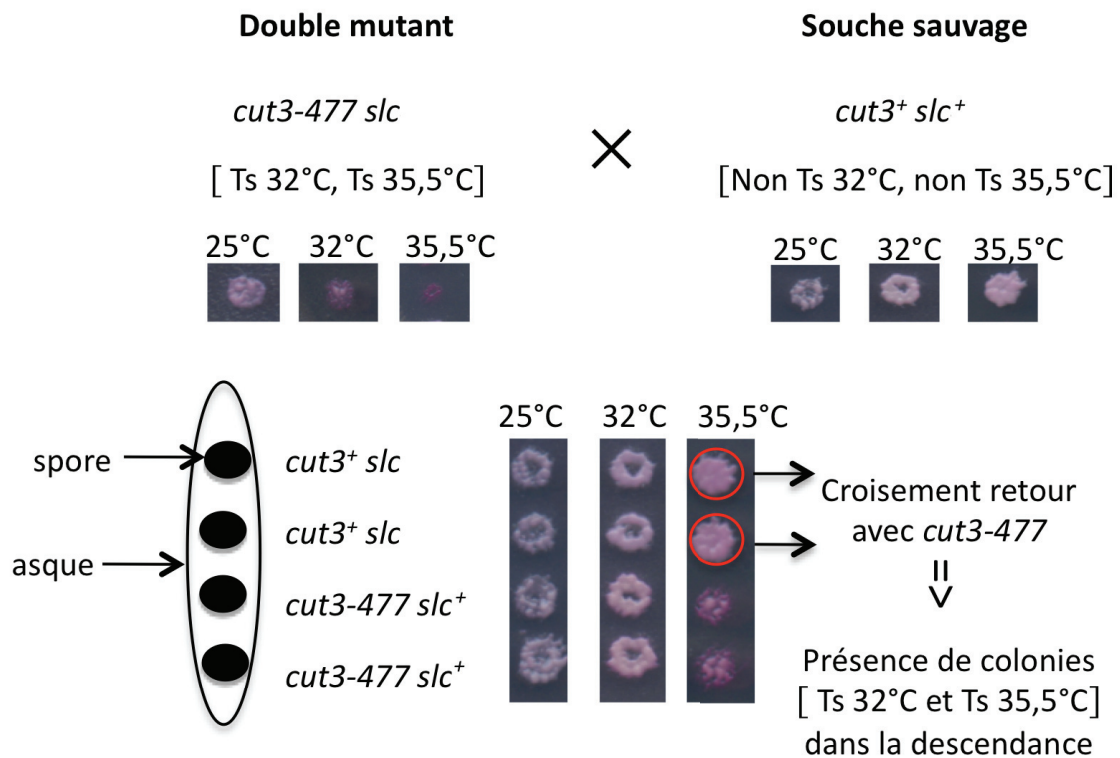


Figure 23 Obtention d'un simple mutant *slc* par analyse de tétrades.

La souche *cut3-477 slc*, viable à 25°C mais morte à 32°C ou à 35,5°C (TS 32°, TS 35,5°) est croisée avec une souche sauvage. Les asques issus du croisement sont isolés et les spores semées. Les quatre colonies formées à partir des spores contenues dans un asque (tétrade) sont répliquées sur le milieu solide contenant de la phloxine B. Les descendants ditypes recombinants, ici *cut3⁺slc*, sont sélectionnés, et la présence de la mutation *slc* d'intérêt, cryptique dans un fond génétique *cut3⁺*, est confirmée par croisement retour avec *cut3-477*

identifiées comme celles conférant une létalité en présence de thiamine indépendamment de *pREP41-cut3⁺* parmi les descendants.

B. Isolement des souches

Sur 180 000 colonies criblées, 190 candidats viables sur PMG 0 Thi et apparemment morts en présence de thiamine ont été sélectionnés à 32°C. Sur les 190 candidats, seulement environ 10% ont été retenus et ont été initialement nommés *slc1* à *slc190*.

Un premier tri a consisté à vérifier le caractère reproductible et suffisamment pénétrant du phénotype ThiS (sensible à la thiamine) pour être traçable par réplique velours. A l'issue de ce test, environ la moitié des candidats a été éliminée. Les restants ont subi un croisement retour avec une souche sauvage afin d'éliminer les candidats porteurs d'une mutation secondaire dans *cut3-477* ou d'une mutation ThiS. Seuls deux mutants conféraient une hypersensibilité à la thiamine mais près de la moitié des candidats s'avéraient porteurs d'une mutation secondaire dans *cut3-477*, suggérant un biais important vers ce type de mutation. Ce biais provient au moins en partie de la détection aisée des colonies rouges vifs (mortes) au milieu des répliques lors de la primo sélection. Enfin, près d'un quart des candidats redonnaient des colonies *cut3-477* mais pas de phénotype ThiS évident, suggérant un déterminisme multigénique du phénotype ThiS. Ces candidats ont également été éliminés. Dix sept mutants *slc* ont été conservés à l'issue de ces tests. Lors du premier croisement avec la souche sauvage, nous avons constaté que certaines mutations *slc*, mais pas toutes, pouvaient être maintenues dans un fond génétique *cut3-477*, en l'absence de *pREP41-cut3⁺*, à la température de 25°C. Les souches doubles mutantes *cut3-477 slc* étaient viables à 25°C mais mortes à 32°C. Le phénotype synthétiquement létal était donc thermosensible. Ces mutations *slc* sont dites « conditionnelles », par opposition aux mutations *slc* « strictes », qui ne peuvent être maintenues dans un fond génétique *cut3-477* en l'absence de *pREP41-cut3⁺*, même à 25°C. Il s'agit des mutations *slc90*, *slc173* et *slc129*.

Chacun des 17 mutants *slc* a subi trois, parfois quatre, croisements retour successifs avec la souche *cut3-477 pREP41-cut3⁺*, pour les mutations *slc* strictes, ou avec la souche *cut3-477* pour les mutations *slc* conditionnelles, afin de purifier la mutation *slc*. Ces croisements retour ont permis de vérifier que le phénotype synthétiquement létal ségrégeait 2:2 dans la descendance, indiquant que la colétalité

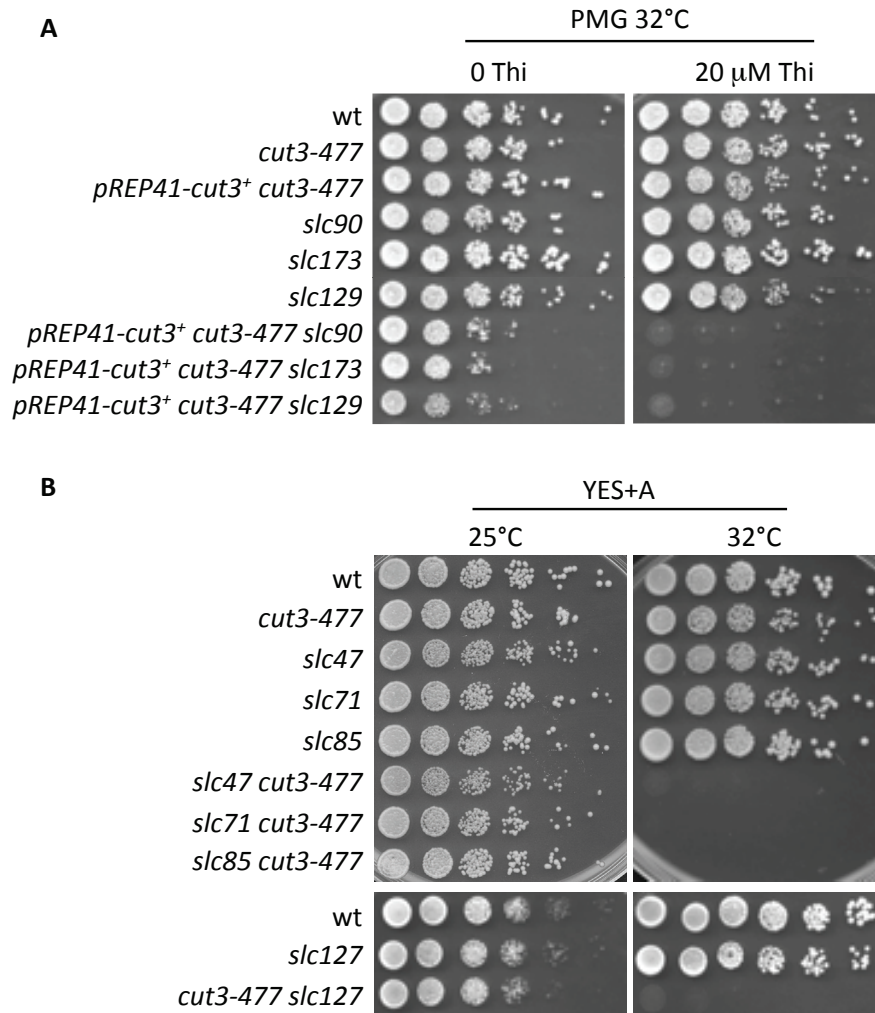


Figure 24 Mutations *slc*, synthétiquement létales avec *cut3-477*.

Les cellules, en phase exponentielle de croissance, ont été déposées en goutte sur YES ou PMG. **A.** Phénotype colétale des mutants *slc* strictes dans un fond génétique *pREP41-cut3+*, après 3 croisements retour. Thi : Thiamine. **B.** Phénotype colétale des mutants *slc* conditionnels.

avec *cut3-477* était conférée par une seule mutation *slc*.

Afin de démontrer formellement le caractère synthétiquement létal avec *cut3-477* des mutations *slc* ainsi sélectionnées, chaque mutation a été isolée dans un fond génétique *cut3⁺* (Figure 23) et le comportement du simple mutant *slc* obtenu a été comparé avec celui du double mutant *cut3-477 slc* correspondant. Concernant les mutations *slc* strictes, comme indiqué dans la Figure 24, les simples mutants *cut3-477 (slc⁺)* ou *slc (cut3⁺)* sont viables à 32°C et leur croissance n'est pas affectée par la présence de thiamine dans le milieu de culture. En revanche, les souches double mutantes *pREP41-cut3⁺ cut3-477 slc* sont viables à 32°C en l'absence de thiamine, lorsque *pREP41-cut3⁺* complémente la mutation *cut3-477*, mais meurent en présence de thiamine, lorsque *pREP41-cut3⁺* est réprimé, démontrant la létalité synthétique entre *cut3-477* et les mutations *slc*. Concernant les mutations *slc* conditionnelles, les simples mutants *cut3-477 (slc⁺)* ou *slc (cut3⁺)* sont viables à 25°C et 32°C. En revanche les doubles mutants *cut3-477 slc*, sont viables à 25°C mais morts à 32°C (Figure 24B). Les mutations *slc* conditionnelles sont donc bien synthétiquement létales avec *cut3-477* à 32°C.

III- Phénotypes macroscopiques additionnels des mutants *slc*

Il a été rapporté que le complexe condensine pourrait jouer un rôle dans l'attachement correct des chromosomes au fuseau en mitose, possiblement au travers de la condensation de la chromatine centromérique (Stear et Roth 2002; Ono et al. 2004; Tada et al. 2011). Condensine intervient également en interphase dans la réparation des dommages dans l'ADN causés par les rayonnements ultraviolets (UV), et dans le point de contrôle de la réplication qui permet aux cellules de détecter une défaillance pendant la phase S. Certains mutants *slc* pourraient être affectés pour l'un et/ou l'autre de ces processus. Afin de tester cette hypothèse, trois tests d'hypersensibilité ont été réalisés.

A. Hypersensibilité au thiabendazole

Les mutations qui affectent l'attachement des chromosomes au fuseau mitotique confèrent généralement une hypersensibilité à des doses sub-létales de drogues

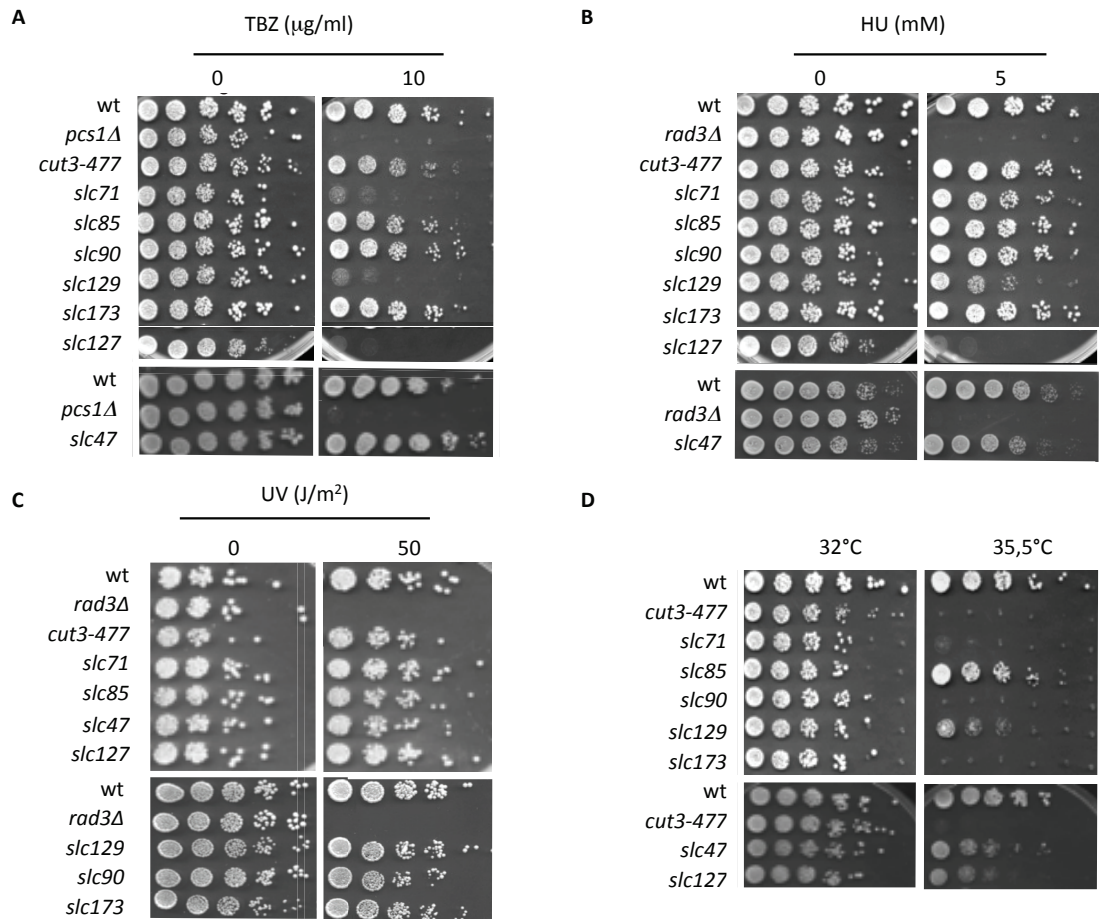


Figure 25. Phénotypes macroscopiques additionnels des mutants *slc*.

Les cellules, en phase exponentielle de croissance, ont été déposées en goutte sur YES+A. **A.** Hypersensibilité au TBZ. **B.** Hypersensibilité à l'HU. **C.** Hypersensibilité aux UV-C. **D.** Thermosensibilité à 35,5°C.

déstabilisatrices des microtubules telles que le thiabendazole (TBZ). Par exemple, la délétion du gène *pcs1*, qui code une protéine centromérique impliquée dans l'attachement des chromosomes au fuseau mitotique, confère une hypersensibilité au TBZ (Gregan et al. 2007). La croissance des simples mutants *slc* a été examinée sur milieu complet contenant des concentrations croissantes de TBZ (Figure 25A). La souche *pcs1Δ* a été utilisée comme contrôle. Seuls les mutants *slc71*, *slc127* et *slc129* ont montré une hypersensibilité au TBZ suggérant que ces mutants pourraient présenter des défauts dans l'attachement des chromosomes au fuseau mitotique.

B. Hypersensibilité au stress génotoxique : HU et UV-C

L'hydroxyurée (HU) est une drogue qui inhibe la ribonucléotide réductase, empêchant la synthèse *de novo* des dNTPs et par conséquent la réplication du génome en phase S. Les rayonnements UV-C (200-280 nm) entraînent la formation de dimères de pyrimidine dans l'ADN. Le gène *rad3* code une protéine kinase nécessaire aux points de contrôle mobilisés en réponse au stress causé par une irradiation UV ou à une défaillance de la réplication en phase S (Bentley et al. 1996). La délétion de ce gène confère une hypersensibilité à des doses sub-létales d'HU ou de rayonnements UV-C.

La sensibilité des mutants *slc* aux rayonnements UV-C ou à des doses sub-létales d'HU a été déterminée par test en gouttes, la souche mutante *rad3Δ* servant de contrôle positif (Figure 25B-C). En accord avec les travaux d'Aono et al, le mutant *cut3-477* n'a pas montré de sensibilité accrue à des doses sub-létales d'HU ou d'UV-C (Aono et al., 2002). Les résultats montrent que les souches mutantes *slc127* et *slc129* présentent une sensibilité accrue à HU, leur croissance est nettement ralentie par rapport au contrôle sauvage en présence d'HU à une concentration de 5 mM (Figure 25B). Au contraire, aucun mutant *slc* ne présente d'hypersensibilité aux rayonnements UV-C (Figure 25C).

L'ensemble de ces résultats suggère que les facteurs affectés par les mutations *slc127* et *slc129* pourraient être impliqués dans la détection d'une défaillance de réplication et/ou la réparation des dommages dans l'ADN causés par une altération de la dynamique de la réplication pendant la phase S.

C. Thermosensibilité, cryosensibilité

Afin de savoir si certaines mutations *slc* conféraient une thermosensibilité ou une cryosensibilité de croissance, des tests de croissance à 20, 32 et 35,5°C ont été réalisés. Aucune des mutations *slc* n'affecte la croissance à 20°C (résultat non montré). En revanche, les mutations *slc90*, *slc71*, *slc127*, *slc129* et *slc173* confèrent une thermosensibilité de croissance à 35,5°C (Figure 25D). Les facteurs affectés par ces quatre mutations sont donc essentiels à la prolifération cellulaire à 35,5°C.

IV- **Analyses génétiques**

A. Groupes de liaison génétique

1. Groupes de liaisons entre les mutations *slc*

Afin de déterminer si les mutations *slc* affectent un même locus ou des loci distincts, nous avons effectué des tests de liaison génétique en croisant les mutants deux à deux. Si deux mutations *slc* en confrontation affectent deux loci distincts, génétiquement indépendants, alors on doit obtenir un quart de recombinants sauvages (*slc*⁺) dans la descendance. Au contraire, l'absence de descendant recombinant sauvage ou leur sous-représentation dans la descendance indiquerait deux mutations *slc* affectant un même locus ou deux loci génétiquement liés.

Les résultats des tests de liaison sont consignés dans le tableau 4. Les croisements des mutants *slc71*, *slc85*, *slc90*, *slc173*, *slc179* et *slc180* réalisés deux à deux n'ont produit aucun recombinant sauvage, révélant une très forte liaison génétique entre ces 6 mutations. Nous avons obtenus le même résultat pour les croisements entre les mutants *slc175*, *slc181* et *slc182*. Les 17 mutations *slc* se répartissent donc en 10 groupes de liaisons définissant donc 10 loci distincts, suggérant ces 17 mutations pourraient affecter 10 gènes de condensation distincts.

Tableau 4. Les mutations *slc* et *sup* se répartissent en 11 groupes de liaisons.

Groupe de liaisons	Mutations <i>slc</i> ^a	Gènes de condensation ^b
I	<i>slc71 slc85 slc90 slc173 slc179 slc180</i>	<i>cut14 (0)</i>
II	<i>slc175 slc181 slc182</i>	<i>cnd1 (0)</i>
III	<i>slc184</i>	<i>cnd3 (0)</i>
IV	<i>slc190</i>	<i>ark1 (0)</i>
V	<i>slc47</i>	
VI	<i>slc127</i>	
VII	<i>slc129</i>	
VIII	<i>slc174</i>	
IX	<i>slc178</i>	
X	<i>slc185</i>	

(a) Test de liaison génétique entre les mutations *slc*. (b) Test de liaison génétique entre les mutations *slc* et des gènes de condensations connus. Entre parenthèse est indiqué le pourcentage de recombinants sauvages. Les mutations écrites en gras correspondent à celles sur lesquelles j'ai travaillé.

2. Test de liaison entre les mutations *slc* et des gènes de condensations connus

Afin de rapidement savoir si les mutations *slc* affectaient des facteurs de condensation connus tels que les sous unités de condensine (*cnd1*, *cnd2*, *cnd3* et *cut14*), la protéine kinase Aurora-B (*ark1*) ou ses sous unités régulatrices (*pic1* et *bir1*), la protéine kinase Polo (*plo1*) ou enfin la topoisomérase II (*top2*), des tests de liaisons génétique ont été réalisés entre les mutations *slc* et chacun des 9 gènes de condensation candidats. Les résultats sont consignés dans le Tableau 4.

Aucune colonie recombinante sauvage n'a été obtenue dans la descendance du croisement entre les souches mutantes thermosensibles *slc90* et *cut14-208*, suggérant que les mutations du groupe de liaison I affectent le gène *cut14*, lequel code la sous unité Smc2 du complexe condensine. Au contraire, les trois mutations *slc47*, *scl127* et *slc129* se sont avérées génétiquement distinctes des neuf gènes de condensation testés. Ces dernières pourraient donc affecter de nouveaux facteurs de condensation.

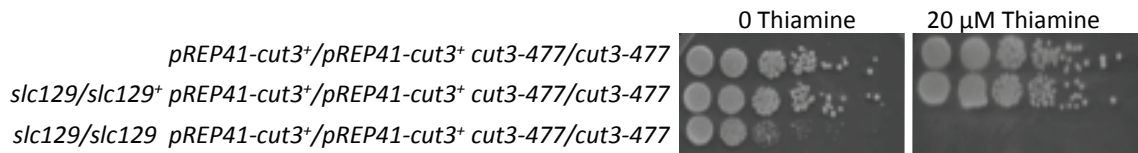
Quant aux résultats obtenus par X. Robellet avec les autres mutations *slc*, également consignés dans le Tableau 4, les résultats montrent une forte liaison génétique entre les mutations *slc175*, *slc181*, *slc182* et le gène *cnd1*, entre la mutation *slc184* et le gène *cnd3*, et entre le gène *slc190* et le gène *ark1*, suggérant que ces mutations pourraient affecter les gènes *cnd1*, *cnd3* et *ark1*, respectivement. Au contraire, les mutations *slc174*, *slc178* et *slc185* sont génétiquement distinctes des 9 gènes de condensation testés.

L'ensemble de ces résultats suggèrent que parmi les 10 groupes de liaisons obtenus, quatre correspondent à de gènes de condensations connus (*cut14*, *cnd1*, *cnd3*, *ark1*). En revanche, les 6 autres groupes pourraient correspondre à de nouveaux facteurs de condensation.

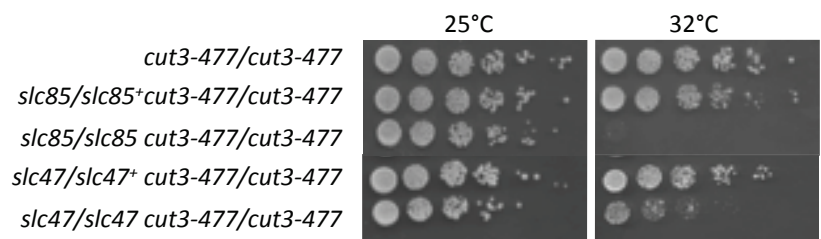
B. Dominance et récessivité

Pour déterminer le caractère récessif ou dominant des mutations *slc*, nous avons construit des souches diploïdes homozygotes mutantes (-/-), hétérozygotes (-/+), et homozygotes sauvages (+/+), et comparé leurs phénotypes. Si la souche diploïde hétérozygote montre un phénotype sauvage, alors la mutation est récessive. Au contraire, si le diploïde hétérozygote montre un phénotype mutant, alors la mutation est

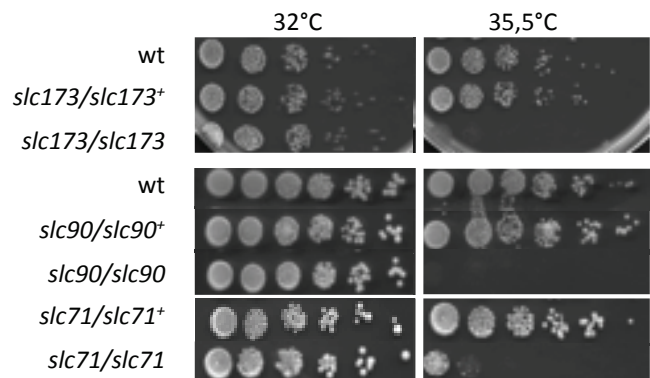
A



B



C



D



Figure 26. Récessivité des mutations *slc*.

A. Les cellules diploïdes, en phase exponentielle de croissance, ont été déposées en goutte sur PMG dépourvu d'adénine (PMG-A). **B-D.** Les cellules diploïdes en phase exponentielle de croissance ont été déposées en goutte sur YES-A

dominante. L'expérience a été menée sur tous les mutants *slc*. Des résultats représentatifs sont présentés dans la Figure 26. L'ensemble des résultats a montré que toutes les mutations *slc* sont récessives. Les allèles récessifs résultent généralement d'une mutation qui inactive le gène affecté, conduisant à une perte de fonction totale ou partielle. On peut donc suggérer que ces mutations *slc* entraînent une altération de fonction du facteur qu'elles affectent.

C. Groupes de complémentation

Les tests de liaison génétique suggèrent que les mutations du groupe de liaison I (*slc90*, *slc71*, *slc173*, *slc179*, *slc180*, *slc85*) pourraient affecter le gène *cut14*. Ainsi ces mutations pourraient être allèles. Afin d'éprouver cette hypothèse, un test de complémentation a été réalisé (Figure 27A). Les mutations ont été confrontées par la construction de trois souches diploïdes : *slc90/cut14-208*, *slc71/slc173* et *slc85/slc71*. Leur phénotype (sauvage ou mutant) a été déterminé. Les mutations *slc90*, *cut14-208*, *slc71* et *slc173* confèrent une thermosensibilité de croissance à 35,5°C. Les résultats obtenus indiquent que les souches diploïdes hétérozygotes *slc90/cut14-208* et *slc71/slc173* sont également thermosensibles à 35,5°C. Il y a donc non-complémentation (Figure 27A-B). De plus, le phénotype thermosensible conféré par la mutation *slc90* peut être complémenté par le gène *cut14* porté par un plasmide multicopie (Figure 27D). Puisque la mutation *slc85* n'est pas thermosensible à 35,5°C, le test de complémentation avec *slc71* a été réalisé en déterminant le phénotype de la souche diploïde *cut3-477/cut3-477 slc85/sl173* à 32°C. La souche diploïde est viable à 25°C, mais morte à 32°C. La persistance de l'interaction colétale avec *cut3-477* montre une non-complémentation entre *slc85* et *slc173* (Figure 27,C). Ces résultats montrent que les mutations *slc71*, *slc85* et *slc173* sont allèles et suggèrent que *slc90* affecte le gène *cut14*.

Les tests de liaison suggéraient que les mutations *slc71*, *slc85*, *slc90*, *slc173*, *slc179* et *slc180* étaient allèles. Le gène *cut14* a alors été séquencé par la méthode Sanger dans chacune des souches mutantes. Les mutations *slc90*, *slc173* et *slc178* sont identiques et correspondent à la substitution C1955T dans le gène *cut14* (numérotation débutant à l'ATG), ce qui entraîne la modification d'une thréonine en une méthionine en position 652 dans la protéine Cut14. Les mutations *slc71*, *slc85* et *slc180* correspondent aux changements G1190A, G1966A et G1853A, respectivement (Figure 27E). *slc85* modifie

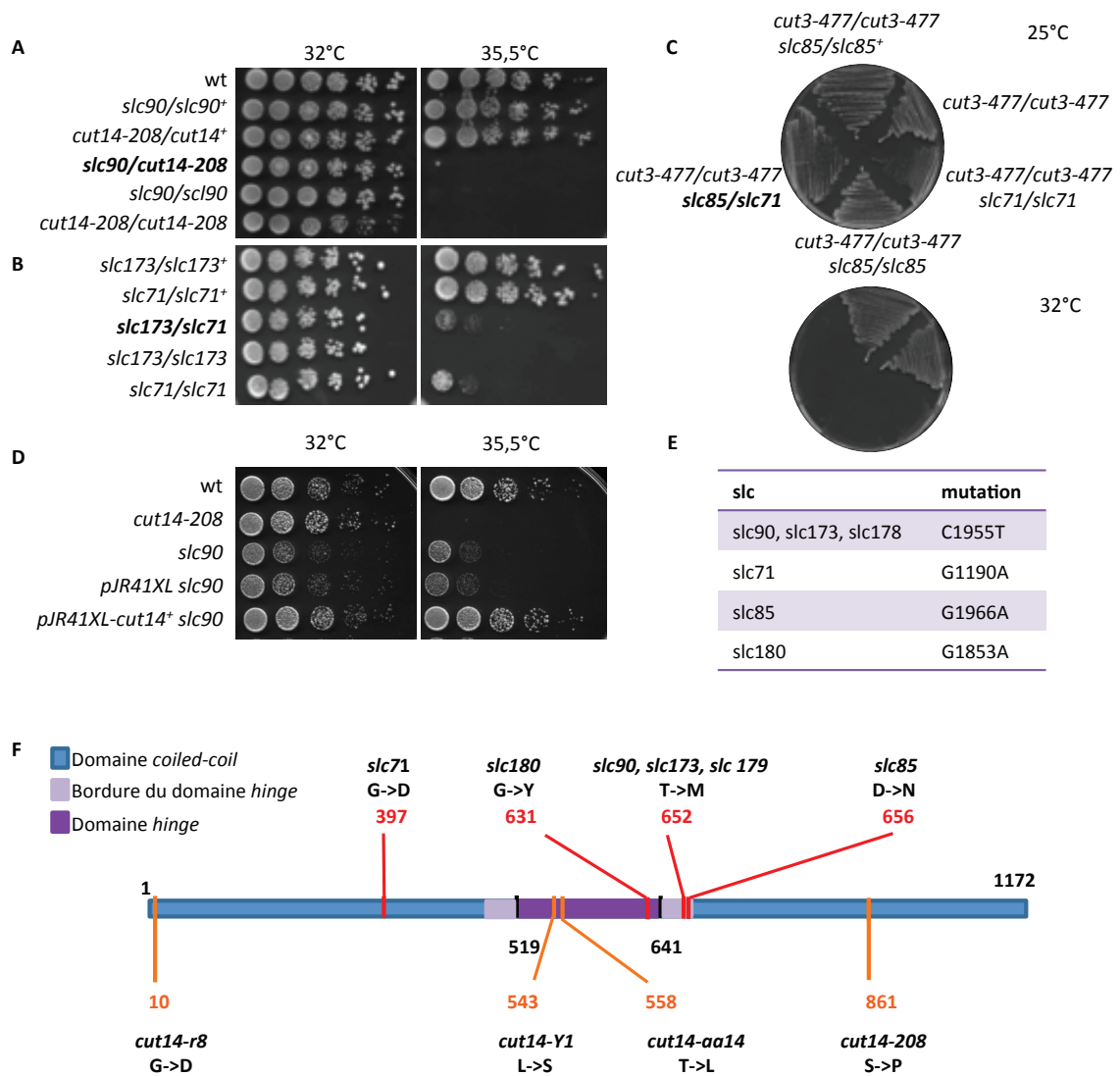


Figure 27 Tests de complémentation des mutations.

A. Non-complémentation entre *slc90* et *cut14-208*. Les cellules diploïdes, en phase exponentielle de croissance, ont été déposées sur YES-A. **B.** Non complémentation entre *slc173* et *slc71*. Les cellules diploïdes, en phase exponentielle de croissance, ont été déposées en goutte sur YES-A. **C.** Non complémentation entre *slc71* et *slc85*. Les cellules diploïdes ont été striées sur YES-A. **D.** Le plasmide *pJR41XL-cut14+* portant le gène *cut14+* restaure la croissance du mutant *slc90* à 35,5°C. Les cellules, en phase exponentielle de croissance, ont été déposées en goutte sur PMG dépourvu d'uracile. **E.** Tableau récapitulatif des mutations affectant le gène *cut14*. **F.** Cartographie physique des mutations de *cut14*.

un aspartate en une asparagine en position 656, *slc180* une cystéine en tyrosine en position 631, et *slc71* se situe dans la région *coiled coil* et correspond à la substitution d'une glycine par un aspartate en position 397. Au niveau protéique, les trois mutations *slc90*, *slc85* et *slc180* affectent la protéine Cut14 au niveau de la région charnière (*hinge*), proche de la région impliquée dans la dimérisation. Nous avons donc isolé 4 allèles de *cut14* différents des mutants *cut14-208*, *cut14-Y1*, *cut14-r8* et *cut14-aa14* (I. Samejima et al. 1993; Akai et al. 2011; Petrova et al. 2013) (Figure 27F). Cette collection de mutants de *cut14* pourrait être précieuse pour la caractérisation fine de condensine.

Les tests de complémentation réalisés par X. Robellet ont montré que *slc175*, *slc181* et *slc182* sont allèles et affectent le gène *cnd1*, que *slc184* affecte le gène *cnd3* et que *slc190* affecte le gène *ark1*. Toutes ces mutations ont été identifiées par séquençage Sanger (Tableau 5 dans le Chap III paragraphe VI « Identification des mutations *slc* »).

A l'issu du crible, nous avons obtenu 17 mutations réparties en 10 groupes de complémentations, affectant 10 loci distincts. Parmi ces 10 loci, 4 correspondent à des gènes de condensation connus. Les allèles mutants ont été renommés par le nom du gène qu'ils affectent suivi du numéro du mutant *slc*. A titre d'exemple, les mutants de *cut14* ont été renommés *cut14-71*, *cut14-85*, *cut14-90*, *cut14-173*, *cut14-178* et *cut14-180*.

D. Expression des gènes de condensation dans les mutants *slc*

Les gènes des sous unités de condensine et de topo II sont essentiels à la viabilité cellulaire. La colétalité entre *cut3-477* et *slc* pourrait être expliquée par un effet indirect des mutations *slc* sur la transcription des gènes de condensine ou de topo II. Afin d'éprouver cette hypothèse, l'expression de ces gènes a été analysée dans les mutants *slc127*, *slc129*, *slc174* et *slc185*. Des RT-qPCR ont été réalisées sur les ARNs totaux (Figure 28). Les résultats montrent qu'il n'y a pas de diminution significative (plus d'un facteur 1,5) de l'expression des gènes de condensine ou de topo II dans chacune des souches mutantes *slc* testées. Ainsi, la colétalité entre les mutations *slc* et *cut3-477* ne résulte pas d'une altération de la transcription des gènes de condensine ou de topo II.

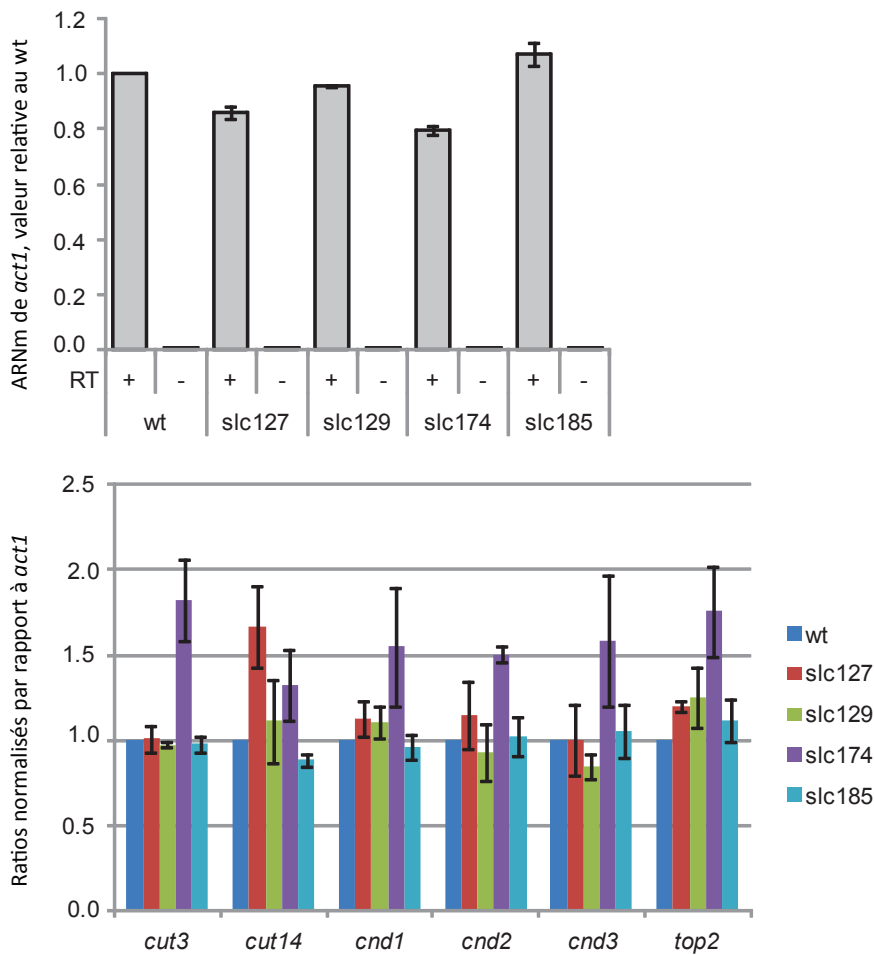


Figure 28. Niveaux à l'équilibre des ARNm de condensine et de topo II chez les mutants slc.

Les ARNs totaux ont été extraits à partir de cultures en phase exponentielle à 32°C. 500 ng d'ARN total ont été reverse-transcrits en présence (+) ou en l'absence (-) de Reverse Transcriptase (RT) et les ADN complémentaires ont été quantifiés par PCR en temps réel. Les valeurs indiquées correspondent à aux moyennes et écarts moyens calculés à partir de deux expériences indépendantes avec deux reverse-transcriptions par expérience.

Concernant le mutant *slc47/gcn5-47*, les résultats sont consignés dans le chapitre IV intitulé « Gcn5 et l'association de condensine à la chromatine ».

V- Analyses cytologiques

Le crible génétique de létalité synthétique avec *cut3-477* à 32°C a été mené pour identifier des facteurs impliqués dans la condensation mitotique des chromosomes. Si les mutations *slc* affectent la condensation, alors des ponts chromatiniens devraient être détectés dans les cellules simples mutantes *slc* en anaphase. Les cellules mitotiques ont donc été identifiées par la présence d'un fuseau mitotique, détecté par immunofluorescence indirecte contre l'alpha-tubuline, et la migration des chromosomes examinée par coloration de l'ADN au DAPI.

A. La mitose chez *S. pombe*

Chez *S. pombe*, il n'y a pas de rupture de l'enveloppe nucléaire en prométaphase, l'assemblage du fuseau ainsi que la ségrégation des chromosomes sont des processus intranucléaires. Les différentes étapes de la mitose observées chez une souche sauvage sont présentées dans la Figure 29A. Les cellules en interphase se caractérisent par la présence d'un réseau de microtubules cytoplasmiques (a). La transition G2/M est marquée par le désassemblage des microtubules cytoplasmiques et la formation du fuseau mitotique (b). Les cellules uninucléées pourvues d'un fuseau court (1 à 3 µm) recouvrent les étapes de la prophase jusqu'à l'anaphase A. En effet, la migration des centromères vers les pôles opposés du fuseau, qui marque l'anaphase A, a lieu sans élongation notable du fuseau de 3 µm (Nabeshima et al. 1998). Cette étape n'est donc pas visible par simple coloration au DAPI. S'ensuit l'anaphase B (c-i). Le fuseau mitotique s'allonge progressivement, ce qui achève la séparation des chromatides sœurs en deux lots distincts. La longueur du fuseau atteint son maximum aux environs de 15 µm. Les images c, d et e correspondent au début de l'anaphase B où les chromosomes sont en cours de séparation : la chromatine trainante entre les deux masses principales situées aux pôles opposés du fuseau (d, e) correspond certainement aux bras des chromosomes. Les microtubules astraux sont parfois visibles aux extrémités du fuseau

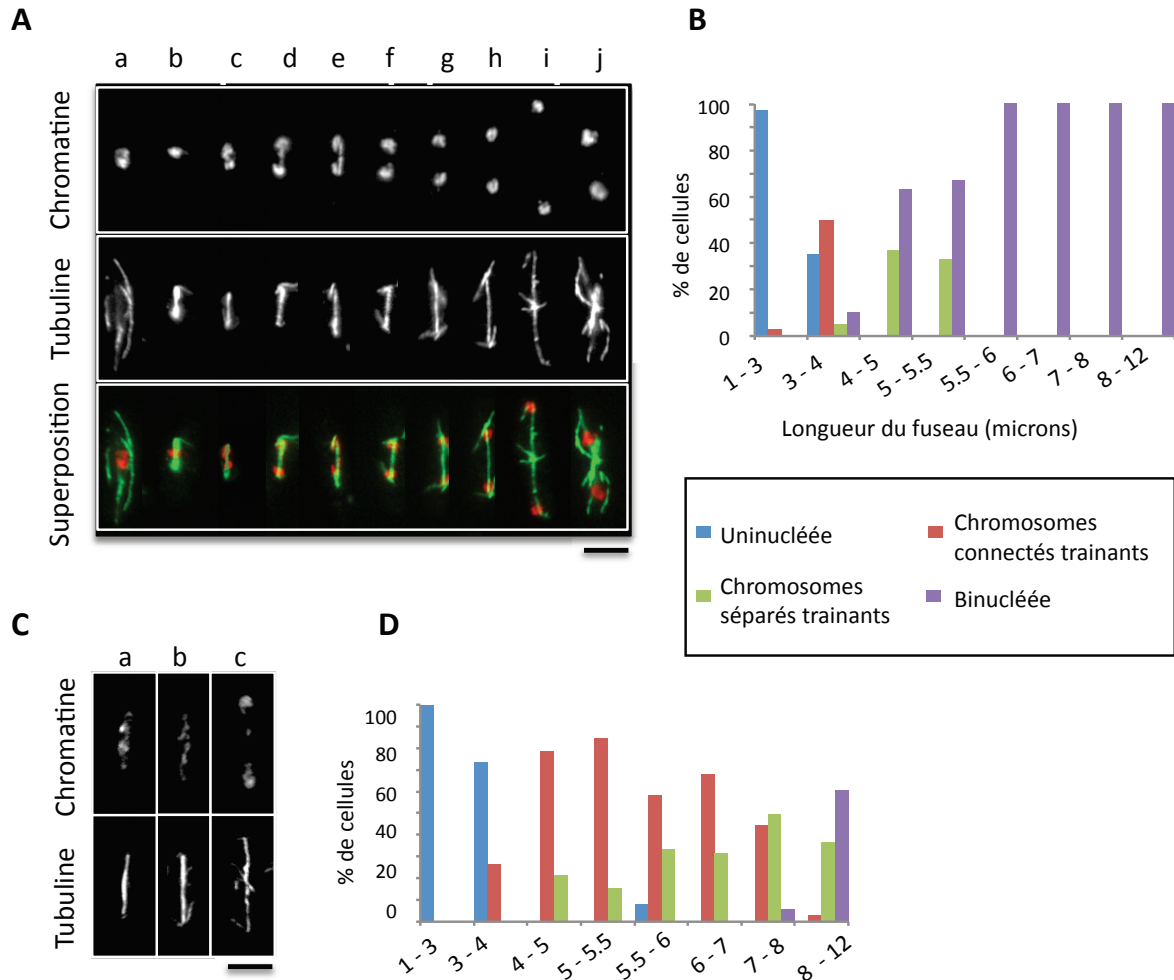


Figure 29 Les étapes de la mitose chez *S. pombe*.

Les cellules sauvages ou mutantes *cut3-477* cultivées en phase exponentielle de croissance en milieu complet à 32°C ont été traitées pour une immunofluorescence indirecte anti alpha-tubuline. La chromatine a été révélée par coloration de l'ADN au DAPI. A-B. Contrôle sauvage. (A) une cellule est montrée par colonne. (B) Fréquences des quatre types morphologiques en fonction de la taille du fuseau mitotique. C-D. Cellules *cut3-477*. a, b) chromosomes connectés trainant (pont chromatinien), c) chromosomes séparés trainants. Barre: 5 microns

mitotique (f-i). En télophase (j), les noyaux font marche arrière pour gagner le centre des futures cellules filles, les chromosomes décondensent et le fuseau mitotique se désassemble pour laisser place aux futurs réseaux de microtubules cytoplasmiques des deux cellules filles.

Si l'on omet la télophase, quatre types de cellules mitotiques peuvent être discernés dans la Figure 29A. Les cellules uninucléées (b), les cellules montrant des chromosomes connectés trainants (c, d), ou des chromosomes séparés trainants (e) et les cellules binucléées (f-i). Ces quatre populations apparaissent successivement avec la progression travers de la mitose qui est mesurable par l'élongation du fuseau (Figure 29B). Les cellules mitotiques uninucléées sont majoritaires quand la taille du fuseau est comprise entre 1 et 3 μm . Les types « chromosomes connectés trainants » et « chromosomes séparés trainants » apparaissent successivement quand le fuseau passe de 3 à 5,2 μm , et disparaissent au-delà de cette longueur. Ces catégories représentent le début de l'anaphase B avec le début de la séparation des bras de chromosome. Les cellules mitotiques binucléées, dépourvues de matériel chromosomique trainant le long de l'axe longitudinal du fuseau, représentent la totalité de la population une fois que le fuseau a dépassé la longueur de 5,2 μm . Ces cellules sont en anaphase B tardive. Notez qu'une séparation totale des chromatides sœurs (absence de chromatine trainante) est fréquemment observée sur des fuseaux dont la taille est comprise entre 4 et 5 μm , révélant une certaine plasticité dans la taille minimale du fuseau requise pour achever la séparation des bras de chromosome. Ainsi, dans un fond génétique sauvage la séparation des chromosomes débute sur un fuseau d'environ 3 μm et est systématiquement achevée quand ce dernier dépasse la longueur de 5,2 μm .

Les analyses cytologiques ont également été réalisées sur des cellules mutantes *cut3-477* cultivées à 32°C. Deux phénotypes cytologiques ont été observés : des ponts chromatiniens ininterrompus, courant d'un pôle à l'autre du fuseau mitotique, et des masses de chromatine trainant sur le fuseau d'anaphase B (Figure 29C-D). Les centromères gagnent les pôles opposés du fuseau dans ~90% des anaphases en l'absence de condensine fonctionnelle au centromère (Nakazawa et al. 2008; Tada et al., 2011). Les ponts chromatiniens traduisent vraisemblablement la difficulté qu'a la cellule à séparer des bras de chromosomes peu condensés. Les masses de chromatine trainantes en anaphase pourrait résulter de la cassure des bras de chromosome peu condensés ou

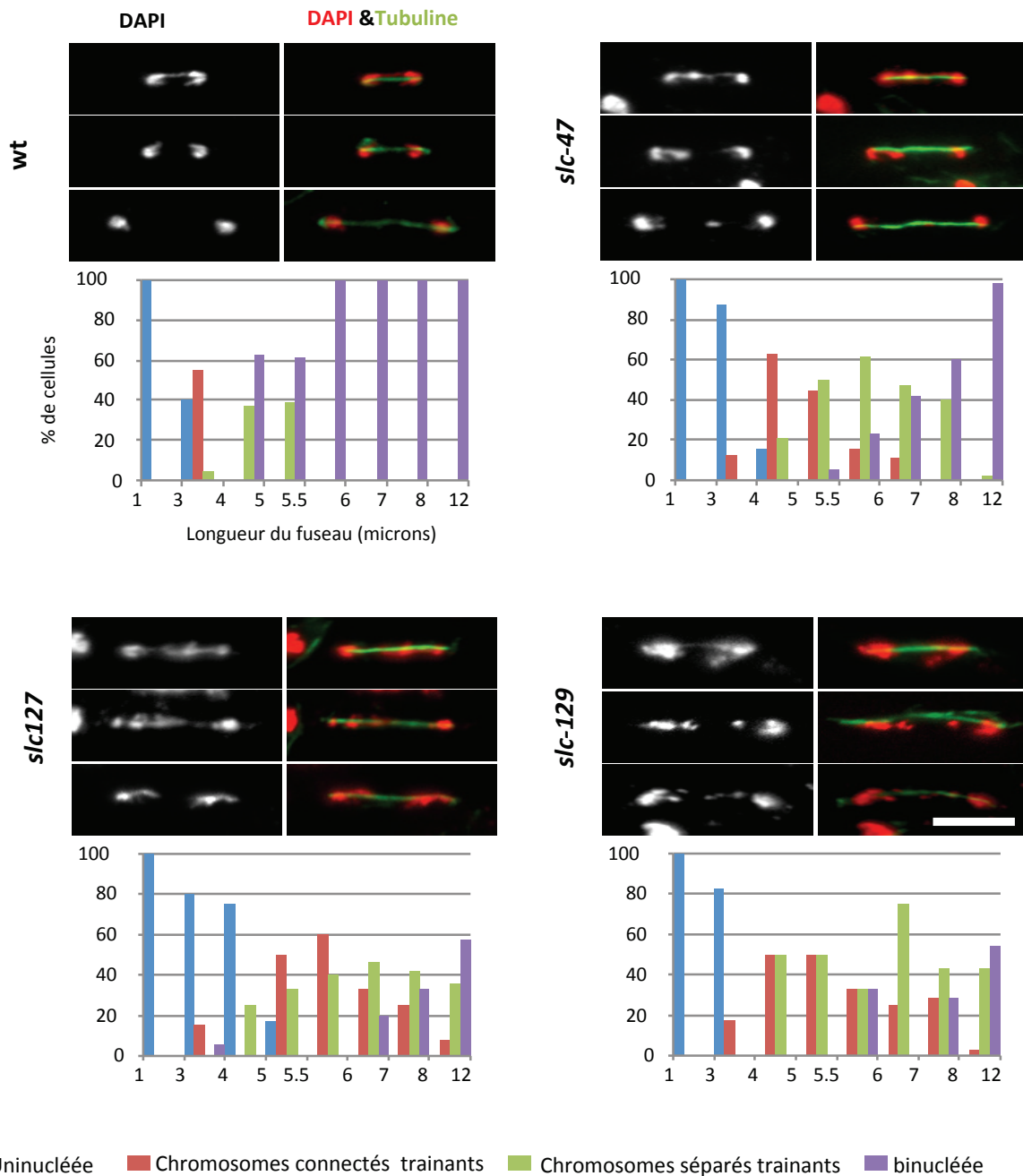


Figure 30. Phénotypes mitotiques des mutant *slc47*, *slc127* et *slc129*.

Les cellules sauvages ou mutantes *slc* ont été cultivées en phase exponentielle de croissance en milieu complet à 32°C pour le mutant *slc47* et à 35,5°C pour les mutants thermosensibles à 36°C *slc127* et *slc129*. Les cellules ont été ensuite traitées pour une immunofluorescence indirecte anti alpha-tubuline. La chromatine a été révélée par coloration de l'ADN au DAPI. Les cellules présentent des chromosomes connectés trainants (1^e ligne des panneaux des mutants) et séparés trainants (2^e et 3^e des panneaux des mutants). Les fréquences (%) des catégories en fonction de la taille du fuseau sont indiquées sous forme de graphiques. Barre : 5 microns

d'une défaillance des centromères (Tada et al. 2011). Les anaphases ont donc été classées en fonction de ces deux phénotypes ; dans la catégorie « chromosomes connectés trainants » quand un pont chromatinien ininterrompu était visible (Figure 29A), et dans la catégorie « chromosomes séparés trainants » quand au moins un signal DAPI traînant était clairement dissocié des signaux présents aux pôles du fuseau mitotique (Figure 29C-D). Comme indiqué dans la Figure 29D, ces deux catégories sont détectées pour des longueurs de fuseau nettement supérieures chez le mutant *cut3-477* comparé au contrôle sauvage. 100% des cellules *cut3-477* pourvues d'un fuseau de 6-7 μm montrent des défauts de migration des chromosomes : ~70% présentent des ponts chromatiniens ininterrompus et ~30% des chromosomes séparés trainants. En revanche quand le fuseau atteint 8-12 μm , les ponts chromatiniens ininterrompus disparaissent quasiment et des cellules binucléées normales apparaissent (60%). Les chromosomes séparés trainants persistent en revanche. Ces observations confirment la présence de ponts chromatiniens chez le mutant *cut3-477* cultivé à 32°C et suggèrent que face à un défaut de condensation mitotique, un fuseau plus long que la normale serait nécessaire pour achever la pleine séparation des bras de chromosome. Cependant, en fin d'anaphase B, la séparation des chromosomes peut être achevée apparemment normalement dans 60% des cas. Les masses chromosomiques qui persistent sur la longueur fuseau, observées dans 40% des cellules en anaphase B tardive, pourraient résulter de la cassure des chromosomes ou bien d'une défaillance centromérique persistante.

B. Les cellules mutantes *slc* montrent des défauts de ségrégation des chromosomes évoquant les mutants de condensine

Comme attendu, les analyses cytologiques réalisées sur les cellules simples mutantes *slc47*, *slc129* et *slc127* ont révélé la présence d'anomalies de migration des chromosomes en anaphase.

Les cellules *slc47* ont montré des anomalies de séparation des chromosomes similaires à celles causées par la mutation *cut3-477* (Figure 30). La fréquence des chromosomes connectés trainants est quasiment doublée chez le mutant *slc47* comparé au contrôle sauvage (Figure 30) et le pic d'apparition est déplacé vers des fuseaux plus longs (4-5, 5

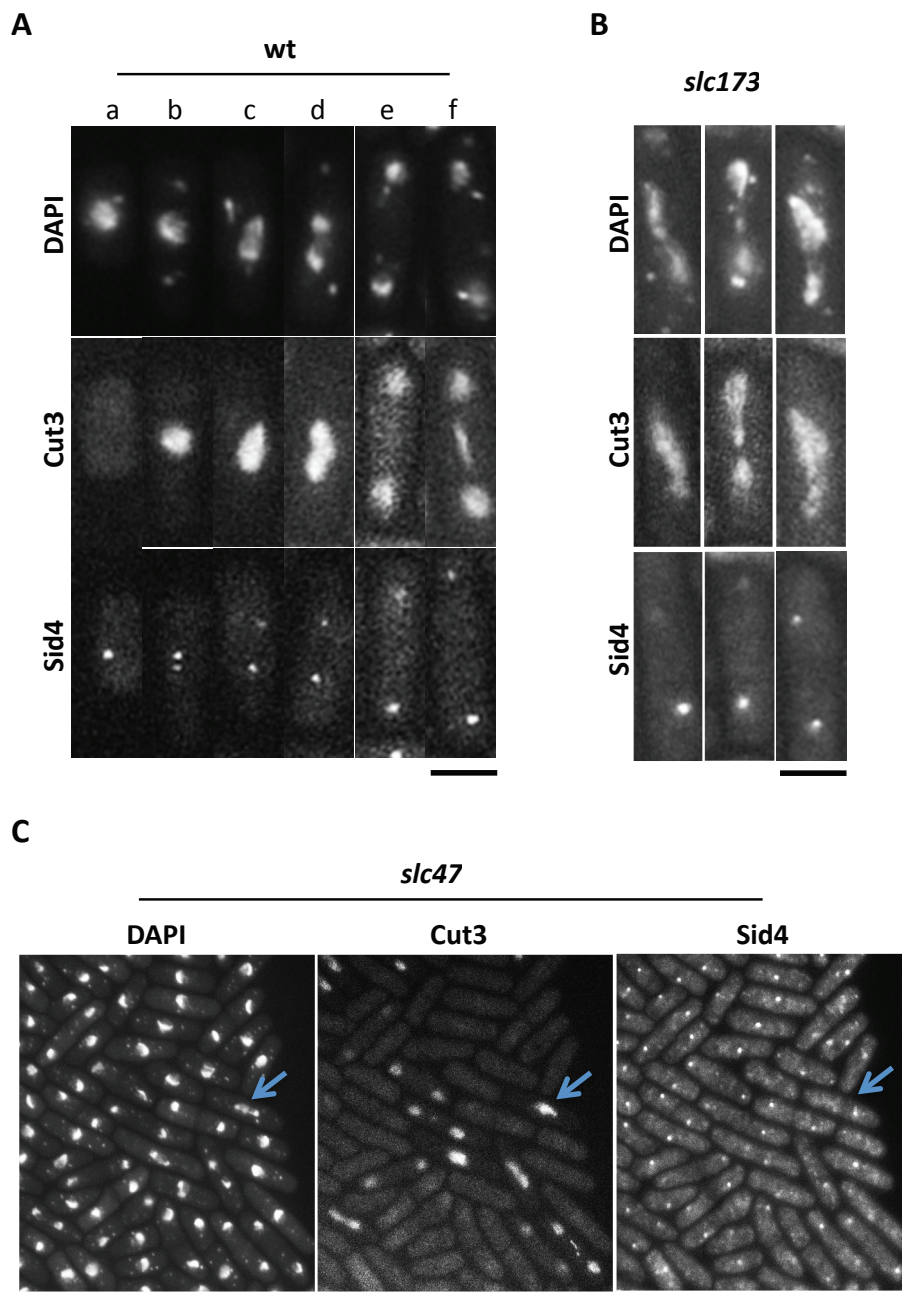


Figure 31. Localisation nucléaire de condensine I chez les mutants *cut14-173* et *slc47*.

Les cellules exprimant les protéines de fusion Cut3-GFP (condensine I) et Sid4-tomato (SPBs) ont été cultivées en phase exponentielle de croissance en milieu complet à 32°C, fixées et observées directement après coloration de l'ADN au DAPI. A. Cellules sauvages. B. Mutant *slc173* (*cut14-173*) Barre (A-B) : 5 microns. C. Mutant *slc47*. Barre 5 microns.

μm contre 3-4 μm). De plus, du matériel chromosomique trainant sur le fuseau en anaphase B est détecté dans environ 50% des cas pour des fuseaux compris entre 6 et 7 μm , de façon similaire au mutant *cut3-477*. En revanche, la fréquence de ces masses chromosomiques trainantes diminue significativement avec l'élongation du fuseau au-delà de 8 μm . Les défauts de migration semblent donc compensés par une élongation du fuseau. Ces observations montrent que la migration correcte des chromosomes est altérée chez le mutant *slc47* et sont cohérent avec un défaut de condensation mitotique dont la pénétrance serait moindre que chez *cut3-477*. Les anomalies de ségrégation montrées par les cellules mutantes *slc129* et *slc127* cultivées à 35,5°C suggèrent encore plus clairement un possible défaut de condensation. Chez ces deux mutants, des ponts chromatiniens et des masses chromosomiques trainantes sont présentes dans les cellules en anaphase B. Contrairement au mutant *slc47*, les ponts chromatiniens ininterrompus sont observables même sur des fuseaux dont la taille est supérieure à 6 μm (Figure 30).

L'ensemble de ces analyses suggère que la condensation mitotique des chromosomes est altérée chez les mutants *slc47*, *slc127* et *slc129*. Concernant les autres mutants *slc*, les analyses ont montré que les mutants présentaient également des défauts de ségrégations des chromosomes (voir la publication Robellet et al, 2014, ci-jointe).

C. Import nucléaire de condensine chez le mutant *slc47*

Le complexe condensine est localisé dans le cytosol en interphase et devient nucléaire en mitose. La mitose étant fermée chez *S. pombe*, condensine doit être importée dans le noyau pour accéder aux chromosomes (Sutani et al., 1999). Cet import est contrôlé par la phosphorylation de Cut3 au résidu T19 par Cdc2 et requiert l'importine α Cut15 (Sutani et al. 1999; Nakazawa et al. 2008). La létalité synthétique entre les mutations *slc* et *cut3-477* pourrait donc être causée par une défaillance d'import nucléaire de condensine. Afin d'éprouver cette hypothèse, la localisation de la protéine Cut3-GFP a été examinée dans les cellules mutantes *slc47* en mitose. La souche mutante de condensine *cut14-173* (*slc173*) a été utilisée comme contrôle. Les cellules mitotiques ont été identifiées en détectant la protéine de fusion Sid4-Tomato. Sid4 est un constituant des SPBs (Spindle Pole Bodies), l'équivalent des centrosomes.

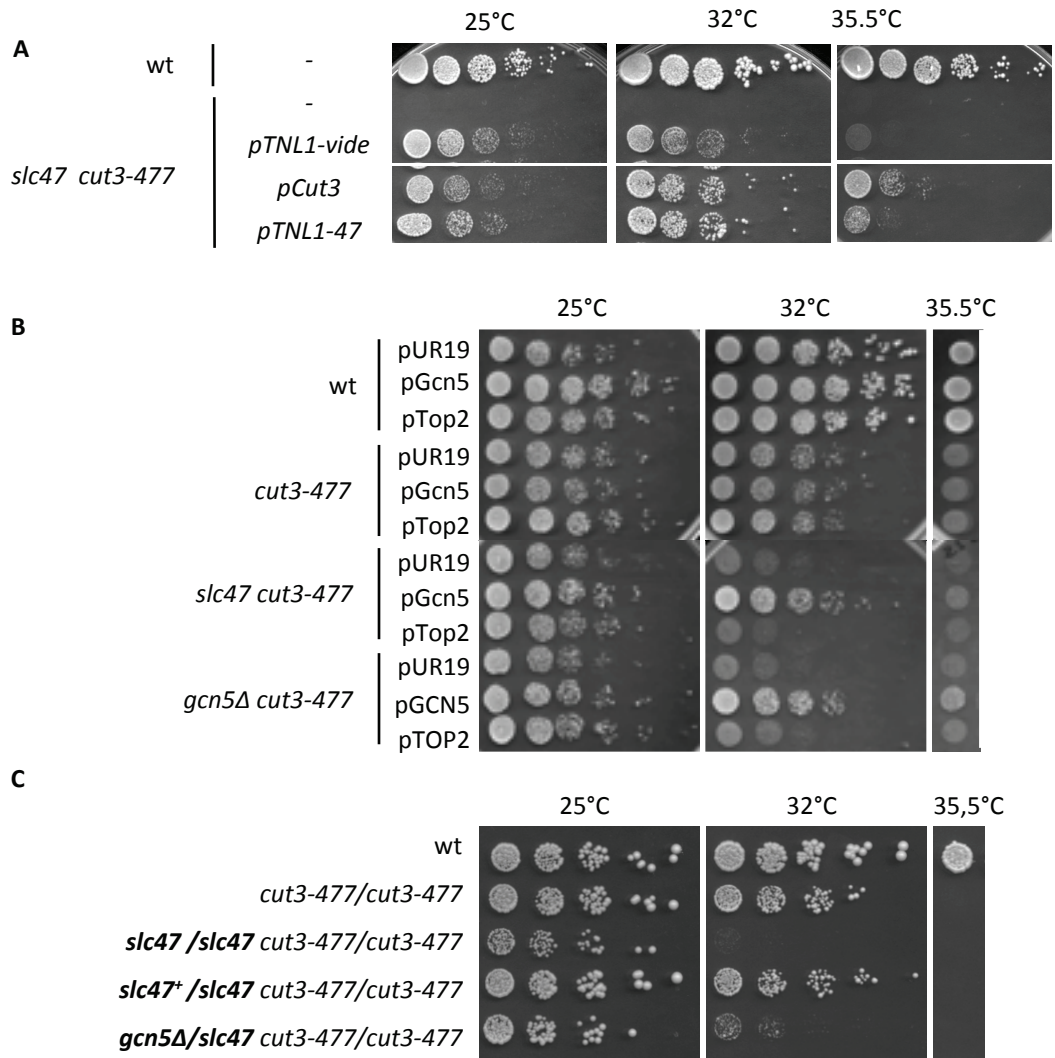


Figure 32. Identification de la mutation *slc47*.

A. Clonage du gène *gcn5* par complémentation fonctionnelle. Les cellules ont été cultivées à 25°C en phase exponentielle de croissance, puis transformées par la banque d'ADN génomique pTN-L1. Les transformants capables de croître à 32°C ont été sélectionnés, pTNL1-47 restaure la croissance de *slc47 cut3-477* à 32°C. **B.** La souche *slc47 cut3-477* a été transformée avec le plasmide pUR19 contenant le gène *gcn5+* (pGcn5), pUR19 vide (pUR19) et pUR19 contenant le gène *top2* (pTop2) et la capacité des transformants à croître à 32°C a été testée par test en gouttes. **C.** Test de complémentation fonctionnelle entre les mutations *slc47* et *gcn5Δ*.

Dans les cellules en interphase, Sid4-Tomato génère un signal unique (Figure 31) et Cut3-GFP est non-délectable dans le noyau. Pendant la mitose, les SPBs dupliqués se séparent avec l'élongation du fuseau, générant deux signaux Sid4-Tomato (Figure 31). La protéine Cut3-GFP est alors enrichie dans le noyau. Le signal Cut3-GFP nucléaire est aisément détectable jusqu'en anaphase B.

Le mutant *slc173* est un mutant de condensine, la mutation affecte la sous unité *cut14*. Aucun défaut majeur dans l'import nucléaire de condensine n'est observé dans ce mutant, même en présence de défaut de migration des chromosomes en anaphase. De même, les cellules *slc47 cut3-GFP sid4-Tomato* n'ont pas montré de défauts flagrants dans le recrutement nucléaire de Cut3-GFP en mitose (Figure 31C). Ici aussi (Figure 31C, flèche bleue), Cut3-GFP est clairement présente dans le noyau des cellules mutantes en anaphase montrant des défauts de migration des chromosomes. Ces données suggèrent que l'import nucléaire du complexe condensine n'est pas significativement altéré dans les fonds génétiques *slc47* et *cut14-173*.

VI- Identification des mutations *slc*

A. Par complémentation fonctionnelle

Les mutations *slc47*, *slc127* et *slc129* sont récessives. Afin d'identifier rapidement ces mutations, nous avons tenté de cloner les gènes correspondants par complémentation fonctionnelle en utilisant les banques d'ADN génomique pUR19-B1 et pUR19-B2 et pTN-L1 (Barbet, Muriel, et Carr 1992; Nakamura et al. 2001).

Le gène *slc47* a été cloné à partir de la banque pTN-L1 par complémentation fonctionnelle du phénotype colétale à 32°C de la souche *slc47 cut3-477* (Figure 32). Il s'agit du gène *gcn5*. Le plasmide pTNL1-47 qui restaure la croissance de la souche *slc47 cut3-477* à 32°C et non à 35,5°C (Figure 32A) contient un insert d'environ 4 kb contenant quatre gènes : *otu2* tronqué en 5', les gènes *SPAC1952.04c*, *gcn5* et *SPAC1952.06c*, en entiers, et *rad1* tronqué en 3'. Comme *slc47*, la mutation nulle *gcn5Δ* est colétale avec *cut3-477* à 32°C (Figure 32B). Le gène *gcn5* a été sous cloné dans le vecteur pUR19 et sa capacité à restaurer la croissance du mutant *slc47 cut3-477* testée. Les résultats montrent que *gcn5* porté par le

Tableau 5. Récapitulatif des mutations *slc* et leurs identifications

	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X
Mutations <i>slc</i>	<i>slc71</i> <i>slc85</i> <i>slc90</i> <i>slc173</i> <i>slc179</i> <i>slc180</i>	<i>slc175</i> <i>slc181</i> <i>slc182</i>	<i>slc184</i>	<i>slc190</i>	<i>slc47</i>	<i>slc127</i>	<i>slc129</i>	<i>slc174</i>	<i>slc178</i>	<i>slc185</i>
Gènes	<i>cut14</i>	<i>cnd1</i>	<i>cnd3</i>	<i>ark1</i>	<i>gcn5</i>	<i>arp9</i>	<i>snf21</i>	<i>cph2</i>	<i>mga2</i>	<i>ulp2</i>
Fonctions	Sous unité de Condensine			Kinase auroraB	HAT	Swi/Snf RSC complexe	ADN Hélicase - RSC complexe	HDAC Remodelage chromatine	Modu- -lateur RNApII	Enzyme de déconju- -gaison de Sumo
Nomen- -clatures des allèles	<i>cut14-71</i> <i>cut14-85</i> <i>cut14-90</i> <i>cut14-173</i> <i>cut14-179</i> <i>cut14-180</i>	<i>cnd1-175</i> <i>cnd1-181</i> <i>cnd1-182</i>	<i>cnd3-184</i>	<i>ark1-190</i>	<i>gcn5-47</i>	<i>arp9-127</i>	<i>snf21-129</i>	<i>chp2-174</i>	<i>mga2-178</i>	<i>ulp2-185</i>
Protéines	G397D D656N T652M T652M T652M C631Y	G667E G912D R1117C	E195K	R241H	G765A	Q13*	E524K	C453Y	Q725*	R81C

Les astérisques (*) représentent des codons stops

plasmide pUR19 restaure la croissance de la souche *slc47 cut3-477* à 32°C mais ne complète pas le phénotype thermosensible de la mutation *cut3-477*, suggérant fortement que *gcn5* complète la mutation *slc47* (Figure 32B). Enfin, un test de complémentation fonctionnelle a montré que la mutation *slc47* appartient au même groupe de complémentation que le gène *gcn5*, confortant l'idée que la mutation *slc47* affecte le gène *gcn5* (Figure 32C). Le séquençage par la méthode de Sanger du gène *gcn5* dans les cellules mutantes *slc47* a révélé une mutation G761A (la numérotation débutant au A du codon initiateur ATG) dans la souche *slc47*. Cette mutation crée un codon stop prématuré. La mutation *slc47* a donc été renommée *gcn5-47*.

Le gène *arp9* a été cloné par complémentation fonctionnelle du phénotype thermosensible à 35,5°C de la souche mutante *slc127*. Le séquençage par la méthode de Sanger des gènes *arp9* et *gcn5* dans les mutants *slc127* et *slc47* ont révélé une mutation du gène *arp9* : C37T (comptage à partir de l'ATG) dans la souche *slc127* et une mutation du gène *gcn5* : G761A dans la souche *slc47*. Et ces deux mutations créent des codons stops prématurés. Ainsi les mutations *slc127* et *slc47* ont été respectivement renommées *arp9-127* et *gcn5-47*.

B. Par séquençage du génome

Les 4 autres gènes *slc*, *slc129*, *slc174*, *slc178* et *slc185*, ont été identifiés par séquençage du génome entier des souches *slc* par la méthode de séquençage à haut débit Illumina HiSeq 2000 réalisé par H. Parrinello au MGX-Montpellier GenomiX. Les data ont ensuite été analysées par P. Bernard et S Janczarsky. Le séquençage des 4 génomes, nous a permis d'identifier 109 ± 8 SNPs (single nucleotide polymorphisms) par souche. Par comparaison deux à deux de la liste des SNPs, nous avons identifié 5 ± 3 SNPs unique à chaque mutant.

Chaque mutation *slc* a été assignée à un chromosome par analyse de co-ségrégation de la mutation *slc* et d'un marqueur auxotrophique (situé sur le chromosome 1, 2 ou 3) dans un fond génétique *rec12Δ*, qui permet de diminuer les taux de recombinaison d'environ 1000 fois lors de croisements homozygotes (Anders et al. 2008). Et parfois quand cela était nécessaire, afin de déterminer la localisation de la mutation *slc* sur le chromosome en question, nous avons utilisé la mutation *swi5Δ* qui permet réduire à la fois les

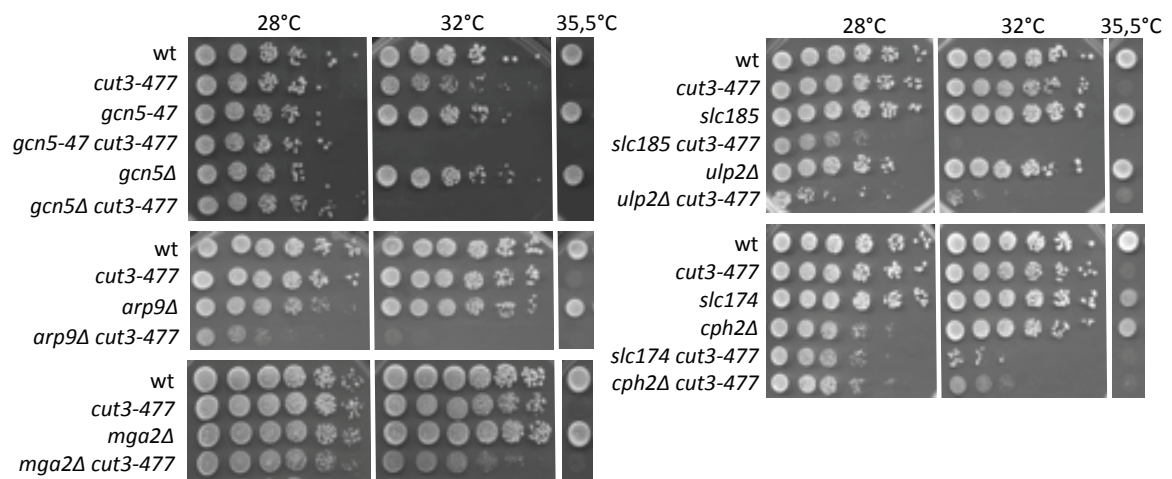


Figure 33. Interaction colétale entre *cut3-477* et les mutations nulles des gènes *slc* non essentiels.

Les cellules, en phase exponentielle de croissance, ont été déposées en goutte sur YES+A

fréquences de recombinaisons intragéniques et intergéniques, diminuant ainsi la distance génétique par rapport à la distance physique entre 2 loci de 5 à 15 fois par rapport aux sauvages (*swi5+*) (Anders et al. 2008). L'ensemble des résultats nous a permis de réduire le nombre de SNP candidats à 3 ± 2 par mutant. Chacune des mutations *slc* a été identifiée par analyses de liaisons génétiques et confirmée par séquençage par la méthode de Sanger (Tableau 5). La mutation *slc129* correspond à *snf21*, *slc174* à *cph2*, *slc178* à *mga2* et *slc185* à *ulp2*. Ainsi les mutations *slc129*, *slc174*, *slc178* et *slc185* ont été renommées *arp9-129*, *cph2-174*, *mga2-178* et *ulp2-185*, respectivement.

A l'exception de *snf21* qui est un gène essentiel, nous avons confirmé que la délétion de *gcn5*, *arp9*, *cph2*, *mga2* ou *ulp2* est synthétiquement colétale avec *cut3-477* à 32°C (Figure 33).

VII- Cas du suppresseur de *cut3-477* : *sup122*

A. Caractérisation initiale du mutant *sup122*

Le crible génétique a également permis d'isoler une mutation qui restaure la croissance de la souche *cut3-477* à la température restrictive de 34°C. Le phénotype « *cut3-477* supprimé » ségrége 2:2 lors des croisements retour, et la mutation responsable est génétiquement indépendante du locus *cut3-477*. La suppression du phénotype thermosensible de *cut3-477* à 34°C est donc conférée par une mutation suppresseur extragénique qui a été baptisée *sup122*. L'effet suppresseur de *sup122* sur la thermosensibilité de *cut3-477* est montré dans la figure 34A. La suppression phénotypique étant, avec la létalité synthétique, un outil génétique efficace pour identifier des gènes qui interagissent fonctionnellement, le mutant *sup122* a été conservé et analysé plus en détails.

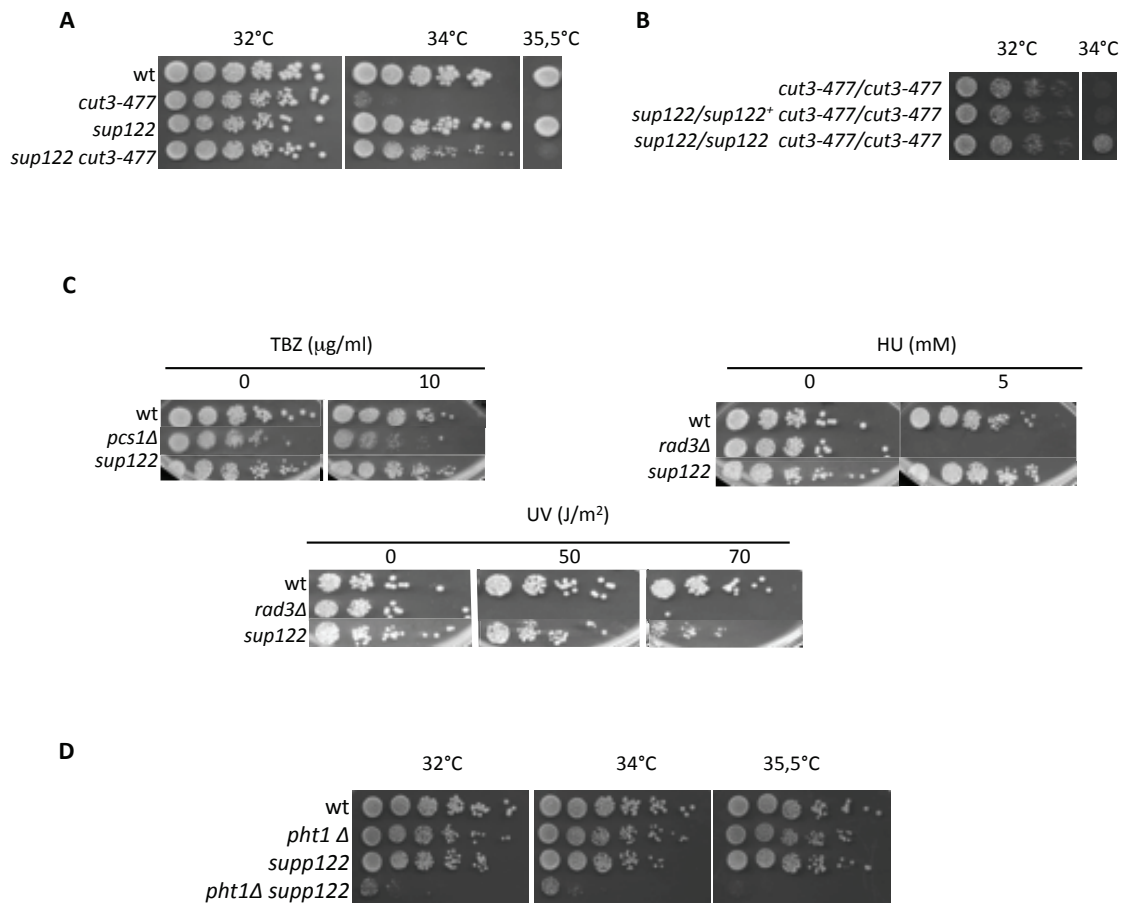


Figure 34. Phénotypes macroscopiques du mutant *sup122*.

Les cellules en phase exponentielle de croissance ont été déposées en goutte sur YES+A. **A.** Phénotype du suppresseur de *cut3-477* à 34°C **B.** Récessivité de la mutation *sup122* par rapport à l'allèle sauvage **C.** Sensibilité au TBZ, HU ou UV-C **D.** Interaction génétique entre *pht1* et *sup122*.

1. Phénotypes macroscopiques

La mutation *sup122* ne confère pas de thermosensibilité à 34 ou 35,5°C (Figure 34A) et est récessive par rapport à l'allèle sauvage (Figure 34B). *sup122* ne confère ni hypersensibilité au TBZ, à la présence d'HU (Figure 34C). En revanche, la souche *sup122* semble légèrement plus sensible aux rayonnements UV-C. Ces résultats suggèrent que le gène affecté par *sup122* n'a de fonction cruciale dans l'attachement des chromosomes au fuseau mitotique ou la réplication de l'ADN pendant la phase S. En revanche, le gène *sup122* pourrait prendre part à la détection et/ou la réparation de dommages dans l'ADN causés par les rayonnements UV-C.

2. Test de liaison

Afin de déterminer si *sup122* affectait un gène de condensation connu, des tests de liaison génétiques ont été réalisés les gènes codant les sous unités de condensine (*cnd1*, *cnd2*, *cnd3* et *cut14*), la protéine kinase Aurora-B (*ark1*) ou ses sous unités régulatrices (*pic1* et *bir1*), la protéine kinase Polo (*plo1*), ou, enfin, topo II (*top2*). Aucune liaison génétique n'a été observée entre la mutation suppresseur et les gènes testés.

La délétion de gène *pht1* qui code le variant d'histone H2A.Z chez *S. pombe* restaure la croissance de la souche mutante *cut3-477* à 34°C (H.-S. Kim et al. 2009). La perte de fonction de la phosphatase Dis2 exerce également un effet suppresseur sur la thermosensibilité de *cut3-477* (Vanoosthuysse et al. 2014). Un test de liaison génétique a donc été réalisé entre *sup122* et les mutations *pht1Δ* ou *dis2Δ*. Le double mutant *cut3-477 sup122* a été croisé avec les souches *cut3-477 pht1Δ* ou *cut3-477 dis2Δ* et la présence de descendants *cut3-477* (simple mutant) a été recherchée dans la descendance. Chaque croisement a produit un quart de descendants recombinants *cut3-477*. Ceci montre que la mutation *sup122* est génétiquement distincte des gènes *pht1* et *dis2*.

De façon inattendue, ces tests de liaison ont révélé une interaction synthétique négative entre les mutations *pht1Δ* et *sup122* : le double mutant *pht1Δ sup122* forme des microcolonies à 32°C alors que les simples mutants montrent une croissance peu ou pas affectée (D). Ceci suggère que *sup122* et *pht1* auraient des fonctions partiellement redondantes au sein d'un processus important pour la viabilité cellulaire.

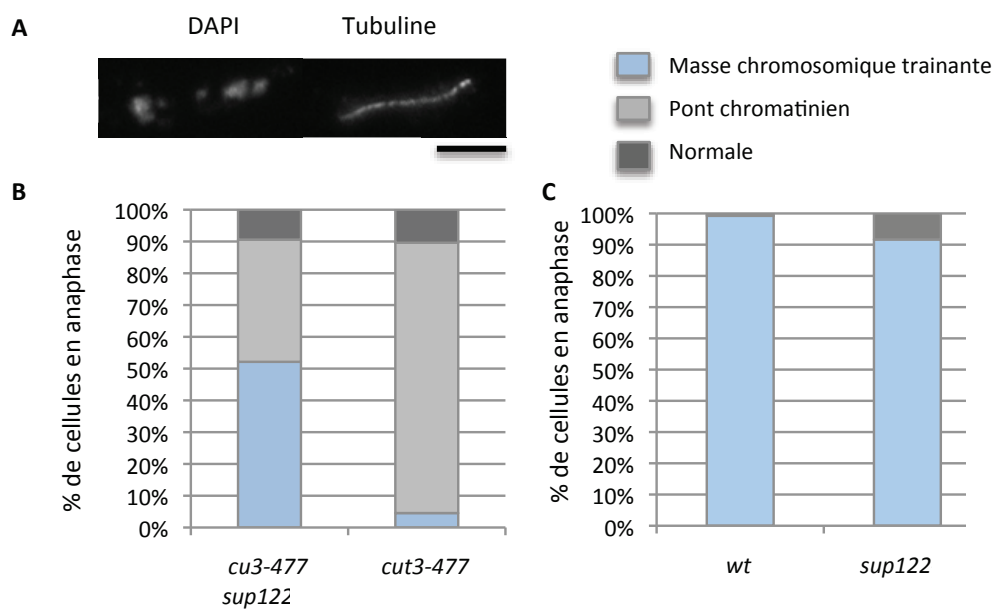


Figure 35. La mutation *sup122* réduit la fréquence des défauts de migration des chromosomes en anaphase chez le mutant *cut3-477*.

Les cellules ont été cultivées en phase exponentielle de croissance en milieu complet à 32°C, transférées à 34°C pendant une génération et traitées pour une immunofluorescence indirecte anti alpha-tubuline. La chromatine a été révélée par coloration de l'ADN au DAPI. **A.** Phénotype « Masse chromosomique trainante » du mutant *sup122*. **B-C** Les défauts de migration des chromosomes en anaphase B ont été comptés (fuseau > 6 microns, n>100).

3. La mutation *sup122* restaure partiellement la migration des chromosomes dans un fond génétique *cut3-477*

Afin de préciser les mécanismes par lesquels la mutation *sup122* restaure la croissance de la souche *cut3-477* à 34°C, la migration des chromosomes en anaphase a été examinée par analyse cytologique des cellules *cut3-477* et doubles mutantes *cut3-477 sup122* cultivées à 34°C. La fréquence des ponts chromatiniens est réduite d'un facteur 2 chez le double mutant *cut3-477 sup122* comparé au contrôle *cut3-477* (Figure 35A). La mutation *sup122* supprime donc partiellement les défauts de migration des chromosomes causés par *cut3-477*.

Etonnamment, l'examen des cellules simples mutantes *sup122*, a révélé la présence de matériel chromosomique trainant sur le fuseau mitotique dans environ 10% des anaphases examinées (Figure 35B). Ainsi, la mutation *sup122*, seule, cause des défauts de migration des chromosomes en anaphase B. Les résultats indiquent que le gène affecté par la mutation *sup122* est requis à la ségrégation normale des chromosomes et que la mutation *sup122* restaure partiellement la ségrégation des chromosomes dans un fond génétique *cut3-477* à 34°C.

B. Identification du gène *nut2*

La mutation suppresseur *sup122* a été identifiée par séquençage à haut débit Illumina en collaboration avec la plateforme GenomiX, combiné à une cartographie chromosomique via l'utilisation de la mutation *rec12Δ* (cf Chap III- VIB « par séquençage du génome ») qui nous a permis de placer la mutation sur le chromosome 2. Le séquençage par méthode de Sanger nous a conduit à une mutation G3A (numérotation débutant à l'ATG) dans le gène *nut2* qui remplace le codon initiateur ATG par un codon isoleucine. Le *sup122* a ainsi été renommé *nut2-122*. Le gène *nut2* code une protéine Nut2 non essentielle, sous unité du complexe médiateur.

Nous avons confirmé que la délétion du gène *nut2* restaure comme *nut2-122* la croissance du mutant *cut3-477* à 34°C (Figure 4 du papier Robellet et al.2014). Et M. Thevenin (stagiaire M1) a analysé la ségrégation des chromosomes du simple mutant *nut2Δ* et des mutants *nut2Δ cut3-477* par rapport à des cellules *cut3-477* et sauvages. Les résultats ont montré une réduction d'un facteur 3 d'anaphases anormales dans les

mutants *nut2Δ cut3-477* par rapport au mutant *cut3-477*, et la présence de défaut de ségrégation des chromosomes, environ 7%, chez le simple mutant *nut2Δ*. L'ensemble des résultats est en accord avec les analyses faites chez les mutants *nut2-122* (ChapIII-paragraphe VII-A-3 « La mutation *sup122* restaure partiellement la migration des chromosomes dans un fond génétique *cut3-477* »). L'ensemble des résultats indique que le gène *nut2* est un suppresseur phénotypique de *cut3-477*. La protéine Nut2 pourrait donc prendre part à la condensation des chromosomes en influençant l'activité de Cut3/condensine.

Chapitre IV- Gcn5 et l'association de condensine à la chromatine

A l'issu du crible, nous avons obtenu 17 mutations *slc* et un suppresseur de *cut3-477*. Parmi ces mutations nous avons identifié des gènes de condensations connus (cf Chap III « Crible génétique pour des mutations synthétiquement létales avec *cut3-477* »), les premières mutations identifiées chronologiquement ont été *gcn5* et ensuite *arp9*. J'ai donc commencé les analyses plus approfondies sur le mutant *gcn5-47*. Les données préliminaires issues du chapitre II, nous montrent que *gcn5-47* est colétale avec *cut3-477*, et que *gcn5-47* elle seule présente des défauts de ségrégation des chromosomes, semblables aux défauts observés dans le mutant de condensation *cut3-477*. Les data issues de la cytologie de *cut3-GFP* suggèrent que ce défaut observé chez le mutant *gcn5-47* n'est pas du à un défaut d'import de condensine dans le noyau en mitose.

Les cartes de l'association de condensine aux chromosomes réalisées dans les cellules de vertébrés (J. H. Kim et al. 2013) et dans les levures à fission et à bourgeonnement (D'Ambrosio et al. 2008), montrent que condensine est enrichie en mitose au niveau des gènes fortement transcrits. De même chez *Bacillus subtilis*, les complexes SMC bactériens (Condensin like) sont recrutés au niveau des origines de réplifications et des gènes fortement transcrits (Gruber et Errington 2009). Alors qu'en entrée en mitose, l'activité transcriptionnelle est fortement réduite voire nulle. Ces data suggèrent qu'il y aurait un lien entre la machinerie transcriptionnelle et l'association de condensine à la chromatine. Or Gcn5 (general control nonderepressed 5) est une HAT (histone acetyl transferase) appartenant au complexe SAGA, un co-régulateur de la transcription. Cette HAT est connue pour acétyler les histones H3K9, H3K14 et H3K18 (Nugent et al. 2010). La protéine Gcn5 est recrutée au niveau des promoteurs des gènes fortement transcrits de façon proportionnellement à leurs niveaux d'expressions, où elle acétyle les histones H3K9 et H3K14 (Robert et al. 2004).

Ainsi, l'étude du rôle de Gcn5 dans la condensation mitotique des chromosomes pourrait nous éclaircir sur le lien établi entre la transcription et la condensation au niveau des gènes fortement transcrits. Dans ce chapitre, après une introduction sur la protéine Gcn5, je présente mes travaux réalisés sur cette protéine en 2 parties. La première partie consiste en la caractérisation initiale de Gcn5 dans la condensation mitotique des chromosomes et la seconde consiste en la caractérisation du lien fonctionnel de Gcn5 dans cette condensation mitotique.

I- Introduction sur Gcn5/GCN5, co-activateur de la transcription

A. Découverte de la protéine Gcn5

Gcn5 est l'une des première HAT identifiées appartenant à la super famille des GNAT (Gcn5-related N-acetyltransferase). Les protéines appartenant à cette super famille sont impliquées dans l'activation de la transcription ou dans la régulation du cycle cellulaire, utilisant l'acétyl-CoA elles acétylent leurs substrats (Vetting et al. 2005). Il a été démontré que la protéine GCN5 de *Tetrahymena thermophila*, *in vitro*, est capable d'acétyler la queue N-terminale des histones H3 en présence d'Acétyl-CoA, le donneur du groupement acétyl (Rojas et al. 1999). Les protéines GNAT correspondent dans la majorité des cas aux histones acétyl-transférase mais il est à noter que certaines protéines GNAT sont capables d'acétyler des protéines non histones, c'est le cas pour la protéine GCN5 (Cai et al. 2011; Paolinelli et al. 2009; J.-H. Kim et al. 2010). L'acétylation de Gcn5 sur des protéines non histones seront détaillées au dernier paragraphe de cette introduction.

Gcn5 a été découverte en 1992, comme activateur de la transcription (Georgakopoulos et Thireos 1992) puis a été identifiée 2 ans plus tard sous le nom de *ada4* (Marcus et al. 1994) lors d'un crible génétique pour identifier des protéines ADA (adaptateur) chez la levure *S. cerevisiae*. De cette étude en ressort que l'activation de la transcription par les protéines Ada2 et Ada3 est dépendante de Gcn5 et que Gcn5 interagit physiquement avec Ada2 (Marcus et al. 1994). La séquence protéique de Gcn5 montre la présence d'un bromodomaine, domaine nécessaire aux fonctions de Gcn5 (Marcus et al. 1994).

En 1995, il est montré qu'une protéine nommée p55 chez *T. thermophila*, un protozoaire cilié, est capable d'acétyler des histones à partir d'acétyl CoA *in vitro* (Brownell et Allis 1995). Et cette protéine p55 présente une forte conservation de séquence (environ 60% de similarité) avec la protéine Gcn5 de levure, suggérant que ces protéines p55 et Gcn5 sont homologues. Un an plus tard, la même équipe publie que Gcn5, comme p55, est capable d'acétyler les histones *in vitro* (Brownell et al. 1996). Cette protéine sera alors appelée tGCN5.

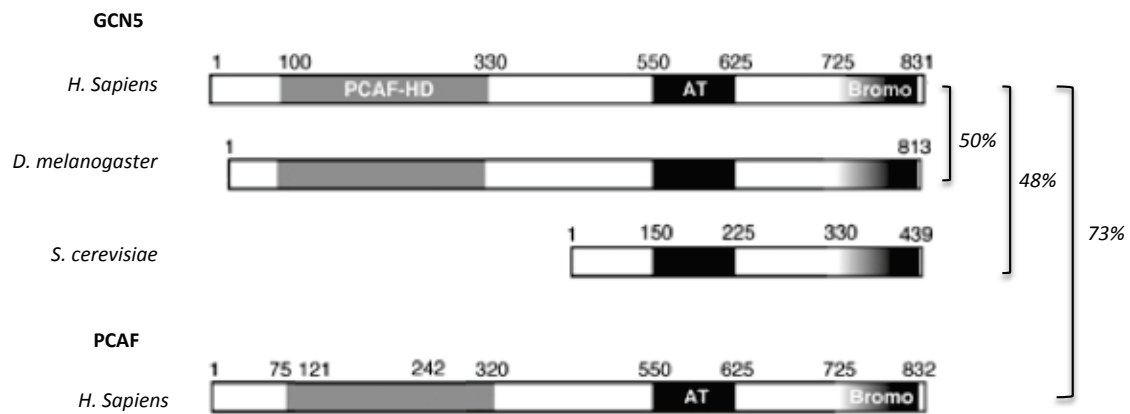


Figure 36. Les protéines GCN5 sont homologues avec les protéines PCAF.

Les domaines AT (acétyl-transférase) et Bromo (Bromodomaine) sont conservés chez toutes les espèces. Chez les vertébrés, ici chez l'homme, GCN5 possède une protéine paralogue PCAF ayant un pourcentage d'homologie de 73% avec GCN5. PCAF-HD représente le domaine d'homologie entre GCN5 et PCAF. Figure modifiée à partir de (Nagy et Tora 2007).

B. Structure de Gcn5, une protéine conservée

Suite aux travaux obtenus chez *T. thermophila* et *S. cerevisiae*, la présence de cette protéine a été recherchée chez d'autres organismes. Les résultats montrent que la protéine GCN5 est présente chez la plupart des métazoaires mais différent au niveau de l'extrémité du N-terminale. De plus, les vertébrés possèdent un second gène codant les protéines PCAF (p300/CREB binding protein [CBP]-associated factor) présentant un peu plus de 70% de similitudes avec la protéine GCN5 (Nagy et Tora 2007) (Figure 36).

Les domaines des protéines GCN5 sont très conservés. Le domaine enzymatique AT pour acétyltransférase est en position centrale et est présent chez toutes les espèces.

La protéine GCN5 possède un bromodomaine situé au niveau de l'extrémité C-terminale. Les bromodomains correspondent en général à des domaines capables d'interagir avec les résidus lysines acétylées de la queue N-terminale des histones H3 et H4. En effet, la protéine GCN5 est recrutée sur les nucléosomes préalablement acétylés via son bromodomaine (Hassan et al. 2002; Hassan et al. 2007). Cependant il est à noter la protéine dGCN5 de drosophile dépourvue de son bromodomaine est capable d'acétyler les histones (Carré et al. 2005), ce qui suggère que le rôle du bromodomaine est redondant avec une autre protéine ou domaine protéique. Le troisième domaine conservé en position N terminale est le domaine PCAF-HD (PCAF- homology domain), absent chez les levures (Figure 36). Ce domaine permet, comme pour les protéines PCAF, l'interaction de GCN5 avec le coactivateur de transcription p300/CBP (W. Xu, Edmondson, et Roth 1998).

C. Gcn5, sous unité du complexe SAGA

Comme la plupart des histones acétyl-transférases, la protéine GCN5 est retrouvée associée à des complexes multiprotéiques. GCN5 est une sous unité du complexe SAGA, un complexe très conservé durant l'évolution de la levure à l'homme (Nagy et Tora 2007). Mais il est à noter que cette protéine est également retrouvée dans d'autres complexes orthologue à SAGA de *S. cerevisiae*, tels que les complexes hSTAGA (human SPT3- TAF(II)31- GCN5L acetylase)(Martinez et al. 1998) et hTFTC (human TBP Free TAF Containing) (Wieczorek et al. 1998), ou encore dans le complexe ATAC (Ada Two A

Containing) présent chez l'homme et la drosophile (Guelman et al. 2006; Guelman et al. 2009). Dans tous ces complexes, l'activité HAT est toujours portée par la sous unité GCN5 ou ses orthologues GCN5-like ou PCAF. Il s'agit donc de complexes de même type et très similaires. Ainsi, je ne décris dans les parties suivantes que la protéine GCN5 au sein du complexe SAGA.

1. Le complexe SAGA co-activateur de la transcription

Le complexe SAGA a été initialement décrit chez *S. cerevisiae* comme un complexe d'environ 2 MDa composé de 19 sous unités (Daniel et Grant 2007). Ce complexe est un complexe très conservé incluant la levure *S. pombe*, *D. melanogaster* et les mammifères. C'est un co-activateur de la transcription par l'ARN polymérase II (ARN pol II). Doté d'activités de modification post-traductionnelle des histones, ce complexe modifie la structure de la chromatine de façon à rendre l'ADN accessible à la machinerie transcriptionnelle. Il est composé de 4 modules (K. K. Lee et al. 2011) (Figure 37).

- le module HAT (histone acetyl transferase), composé de Gcn5/GCN5, ses deux sous unités régulatrices Ada2/ADA2b et Ada3/ADA3 (adaptor proteins), et la protéine Sgf29/SGF29 (SAGA associated factor 29) (Figure 37, module vert). Les protéines adaptatrices sont des cofacteurs faisant le lien entre les régulateurs et la machinerie transcriptionnelle. La protéine Sgf29/SGF29 interagit directement avec ada3/ADA3 (K. K. Lee et al. 2011) et est dotée d'un domaine Tudor, lui permettant de se fixer sur les histones H3K4 di ou tri méthylées (Bian et al. 2011; Vermeulen et al. 2010). Le module HAT de SAGA est connu pour acétyler préférentiellement les histones H3K9, H3K14, H3K18 et H3K23, au niveau des promoteurs des gènes fortement transcrits (Grant, Berger, et Workman 1999).. SAGA acétyle également H4K5 et H4K12 chez la drosophile (Nagy et Tora 2007).
- Le module DUB (deubiquitinase), composé en partie de Sgf11, Sus1 et Sgf73 chez les levures, permet le recrutement de l'ubiquitine hydrolase Ubp8 au complexe SAGA (Figure 37, module violet). L'activité DUB de SAGA est nécessaire à la déubiquitination de l'histone H2B principalement au niveau du résidu K123, ce

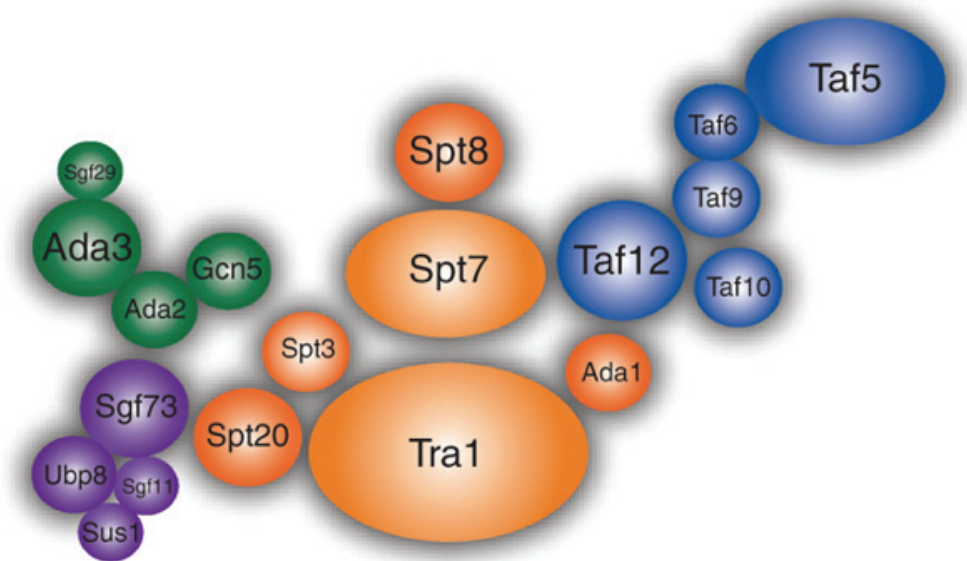


Figure 37. Le complexe SAGA se compose de 4 modules fonctionnels.

Le module vert correspond au module HAT (Histone Acétyl-transférase), le module violet au module DUB (dé-ubiquitination), le module bleu au module TAF (TBP associated factor) et enfin le module orange correspond au module Tra1/SPT. D'après (K. K. Lee et al. 2011).

- qui faciliterait la transcription. Cette activité H2B DUB est en corrélation à la méthylation H3K4 et H3K36 (Henry et al. 2003; Zhao et al. 2008).
- Le module TAF composé de plusieurs protéines TAF (TBP associated factor) également présentes dans le facteur général de transcription TFIID (TAF5, TAF6, TAF9, TAF10 and TAF12) (Figure 37, module bleu). Avec les protéines Ada1/ADA1, Spt7/SPT7, Spt20/SPT20, les protéines TAF forment le cœur architectural du complexe SAGA. Certaines de ces protéines possèdent des domaines HFD (histone fold domain). Ces domaines peuvent interagir ensemble permettant la formation de dimères et des interactions stables pour l'assemblage de SAGA, ou interagir avec des histones permettant l'interaction de ce module avec les histones nucléosomiques (Spedale, Timmers, et Pijnappel 2012). Les mutants *ada1Δ spt7Δ* ou *spt20* présentent des défauts d'assemblage du complexe SAGA (Grant et al. 1997; D E Sterner et al. 1999), indiquant que les protéines Ada1/ADA1, Spt7/SPT7 et Spt20/SPT20 sont nécessaires à l'intégrité du complexe SAGA. La protéine Spt7 est pourvue d'un bromodomaine, comme Gcn5, mais ne semble pas interagir avec les histones acétylées au sein de SAGA (Hassan et al. 2002).

Le module Tra1/SPT (Figure 37, module orange) au sein duquel Spt3 et Spt8 permettent le recrutement de la machinerie transcriptionnelle au niveau de la TATA box, en interagissant directement avec les facteurs généraux tels que TBP (TATA binding protein), et ainsi initie la transcription par la RNA pol II (Weake et Workman 2012). Tra1 connecte physiquement SAGA à certains activateurs de la transcription. C'est une grosse protéine représentant environ 25% de la masse du complexe SAGA. L'interaction physique entre Tra1 et les activateurs de la transcription fixés au niveau de promoteurs de gènes participe au recrutement de SAGA (Weake et Workman 2012). TRRAP (Transformation/ Transcription domain-Associated Protein) est l'homologue de Tra1 chez l'homme. De plus, il semblerait que cette protéine d'environ 400kb ait également un rôle pour la stabilité du complexe SAGA chez *S. cerevisiae* (Knutson et Hahn 2011), mais non chez *S. pombe*, grâce à la présence d'un paralogue Tra2 (Helmlinger et al. 2011).

Ainsi le complexe SAGA possèdent deux activités enzymatiques modifiant les histones : l'activité d'acétylation au sein du module HAT et l'activité d'ubiquitination au sein du module DUB. Ce complexe possède des protéines architecturales et des protéines de liaison avec l'ADN.

2. SAGA régule la transcription

Le complexe SAGA se lie à la chromatine au niveau des promoteurs des gènes via le bromodomaine de Gcn5 (Hassan et al. 2002). Comme décrit précédemment, le module HAT via l'activité acétyl-transférase de Gcn5 acétyle les queues N-terminales des histones H3, ce qui entraîne le recrutement de complexes possédant un domaine de liaison aux résidus lysines acétylés et facilite l'accès à l'ADN à la machinerie transcriptionnelle (Nagy et Tora 2007). Chez la levure *S. cerevisiae*, l'acétylation des histones par le complexe SAGA entraîne le recrutement du complexe de remodelage de la chromatine SWI/SNF via le bromodomaine de sa sous unité Swi2/Snf2 permettant ainsi l'ouverture de la chromatine pour l'accès à la machinerie transcriptionnelle sur l'ADN (Hassan, Awad, et Prochasson 2006). Il est également à noter que chez les levures *S. pombe* et *S. cerevisiae*, Gcn5 participerait également à l'éviction des nucléosomes au niveau de certaines régions transcrites par l'ARN pol II (Govind et al. 2007; Sansó et al. 2011).

Les profils d'expression des gènes chez les levures ont été réalisés chez les mutants pour les sous unité de SAGA non essentielles (Helmlinger et al. 2008; Lenstra et al. 2011), et analysé par micro arrays. De ces études en ressort que les profils d'expressions de chacune de ces souches ne sont pas tous identiques mais se répartissent en plusieurs groupes distincts classés suivant la fonction du module et la fonction structurale de la protéine délétée. Le seul et unique groupe de profils d'expressions identiques observé chez *S. cerevisiae* et aussi chez *S. pombe* est celui composé des mutants *gcn5Δ*, *ada2Δ* et *ada3Δ*. Un second groupe constituée par les mutants *spt7Δ* et *ada1Δ*. des protéines architecturales du complexe SAGA présente le phénotype transcriptionnelle le plus fort avec le plus grand nombre de gènes dérégulés.

Chez *S. pombe*, la délétion de *gcn5Δ* affectent 57 gènes dont le niveau expression est de plus de deux fois supérieur ou inférieur par rapport à son niveau d'expression dans une cellule sauvage ; ce qui représente un peu plus de 1% des gènes totaux de *S. pombe*

(Helmlinger et al. 2008). Parmi ces gènes, la plupart sont impliqués dans la différenciation sexuelle, le *mating type* et la méiose.

Il est à noter qu'il existe une redondance fonctionnelle avec les HAT Mst2 et Elp3 pour la régulation de l'expression de certains des gènes Gcn5-dépendant (Nugent et al. 2010).

3. Le module HAT

Le fait que les mutants *gcn5Δ*, *ada2Δ* ou *ada3Δ* présentent le même phénotype transcriptionnel indique que ces gènes sont impliqués dans le même processus. Ada2 stimule l'activité acétyl-transférase de Gcn5 sur les histones *in vitro* (Gamper, Kim, et Roeder 2009; David E Sterner et al. 2002) et la protéine Sgf29 semble également nécessaire à cette activité acétyl-transférase *in vivo* (Bian et al. 2011).

Il a été montré que chez *S. cerevisiae*, le module HAT est lié au complexe SAGA par sa sous unité Ada2. En effet, la délétion de Gcn5 ou de Sgf29 n'affecte pas l'association de Ada2 et Ada3 au complexe SAGA, par contre la délétion de Ada2 entraîne la dissociation de Ada3, Gcn5 et Sgf29 du complexe. Chez *S. cerevisiae*, une partie du complexe HAT est retrouvée également non associée au complexe SAGA (Eberharther et al. 1999; Grant et al. 1997). Il s'agit de Gcn5 et des sous unités Ada2 et Ada3. On retrouve cette association de protéines sous le nom du complexe ADA. Sont également associées des protéines absentes du complexe SAGA comme Ahc1 (ADA HAT complex component 1) jouant un rôle dans l'intégrité de ce complexe (Eberharther et al. 1999) et Ahc2 (K. K. Lee et al. 2011). La délétion du bromodomaine de Gcn5 altère l'activité d'acétylation des nucléosomes dans le complexe SAGA, cependant pas dans le complexe ADA (Eberharther et al. 1999). Gcn5 aux seins des deux complexes acétylent les histones. Ces résultats suggèrent que ces deux complexes ont des actions spécifiques dépendant des protéines environnantes.

4. Gcn5 acétyle également des protéines non histones

L'activité de Gcn5 n'est pas restreinte à l'acétylation des histones. Il a été montré chez *S. cerevisiae* que Gcn5 est capable d'acétyler des sous unités de son propre complexe SAGA (Cai et al. 2011). Les auteurs de ces travaux ont montré que la délétion de Gcn5 entraîne la dé-acétylation de certaines sous unités telles que Ada3, Sgf73 et Spt7, suggérant que Gcn5 est responsable de l'acétylation de ces protéines. De plus, il est à noter que la

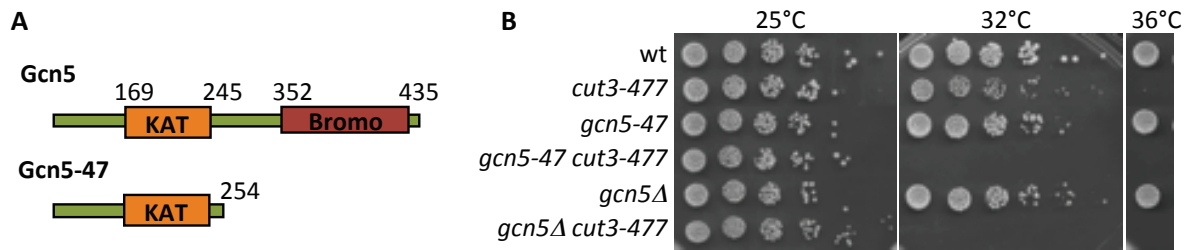


Figure 38. Gcn5 devient essentielle lorsque Cut3 est partiellement déficiente à 32°C.

A. La mutation *gcn5-47* engendre une protéine Gcn5 tronquée dépourvue de son bromodomaine. **B.** La déficience de *gcn5* est colétale avec *cut3-477* à 32°C. Les cellules, en phase exponentielle de croissance ont été déposées sur YES+A.

protéine Gcn5 est également capable d'acétyler des protéines hors complexe SAGA et non histone, telles que CDC6 chez l'Homme et Snf2 chez la levure *S. cerevisiae* (Paolinelli et al., 2009 ; Kim et al 2010).

Paolinelli et al. ont démontré chez les cellules humaines, que la protéine GCN5 interagit physiquement avec CDC6 et acétyle CDC6 sur les résidus lysines 92, 105 et 109 *in vivo*. CDC6 est une protéine du complexe pre-RC (pre-replicative complex), assemblé et activé en début de phase G1. Son acétylation par GCN5 régule sa phosphorylation par la Cycline A durant la phase S afin d'être exportée du noyau vers le cytosol puis être dégradée. Le complexe SWI/SNF est un complexe de remodelage de la chromatine qui utilise de l'ATP pour remodeler la structure des nucléosomes, ce qui est nécessaire à la régulation de la transcription de certains gènes. L'acétylation de la sous unité Swi2/Snf2 sur les résidus lysines en position 1493 et 1497 par Gcn5 permet la dissociation du complexe de la chromatine (J.-H. Kim et al. 2010).

II- Caractérisation initiale de Gcn5 vis à vis de la condensation mitotique des chromosomes

A. Gcn5 est essentielle lorsque Cut3 est partiellement déficiente

La mutation *gcn5-47* est une mutation non-sens G761A qui crée un codon stop prématuré en position 255. La protéine Gcn5-47 est amputée de son bromodomaine (Figure 38A). Gcn5 n'est pas essentielle à la viabilité cellulaire. En revanche sa perte de fonction est létale dans un fond génétique *cut3-477* (Figure 38B), suggérant que Gcn5 pourrait prendre part à la condensation mitotique des chromosomes.

B. Gcn5 est nécessaire à la ségrégation des bras de chromosomes

Lors des analyses cytologiques des mutants *slc* (cf Chap III « Crible génétique pour des mutations synthétiquement létales avec *cut3-477* »), j'avais observé des ponts

chromatiniens en début d'anaphase B dans les cellules mutantes *gcn5-47* (Chap III- VB « Les cellules mutantes *slc* montrent des défauts de ségrégations des chromosomes évoquant les mutants de condensine »). La présence de ponts chromatiniens en anaphase chez le mutant *gcn5-47* est cohérente avec un défaut de condensation mitotique ou une altération de la résolution des chromatides sœurs. Cependant, des données suggèrent que Gcn5 peut être nécessaire au bon fonctionnement des centromères chez *S. cerevisiae* (Vernarecci et al. 2008), et il est formellement possible que les ponts chromatiniens observés dans les cellules mutantes *gcn5* correspondent en fait à des chromosomes entiers trainant au centre du fuseau.

Afin de déterminer si les défauts de migration des chromosomes en l'absence de Gcn5 fonctionnelle résultaient ou non d'un défaut de condensation mitotique, j'ai observé la migration des centromères ainsi que celle des bras du chromosome III en anaphase chez le mutant *gcn5*.

1. Analyse de la ségrégation des chromosomes avec marquage des centromères et SPB chez le mutant *gcn5-47*

J'ai construit les souches *mis6-HA cdc11-GFP*, *mis6-HA cdc11-GFP gcn5-47* et *mis6-HA cdc11-GFP cut3-477* afin de pouvoir suivre, par analyses cytologiques, la migration des chromosomes et des centromères en fonction de la taille du fuseau mitotique. Mis6 est une protéine centromérique (S. Saitoh, Takahashi, et Yanagida 1997), et Cdc11 est une protéine des SPB (Krapp et al. 2001).

Les cellules mitotiques ont été identifiées par la présence Cdc11-GFP, détectée par immunofluorescence indirecte contre la GFP et la distance entre les deux lots de signaux GFP correspond à la longueur des fuseaux mitotiques mesurée. La migration des centromères a été suivie par la présence de Mis6-HA détecté par immunofluorescence indirecte contre HA. Enfin, la migration des chromosomes a été examinée par coloration au DAPI (Figure 39).

En métaphase, les SBP sont dupliqués et se situent de part et d'autre du noyau et les centromères sont localisés entre les SBP (Figure 39A). A ce stade les chromosomes ni sont pas séparés, ni entrés en migration. En début d'anaphase, les centromères gagnent les pôles opposés du fuseau mitotique, la migration des chromosomes débute créant

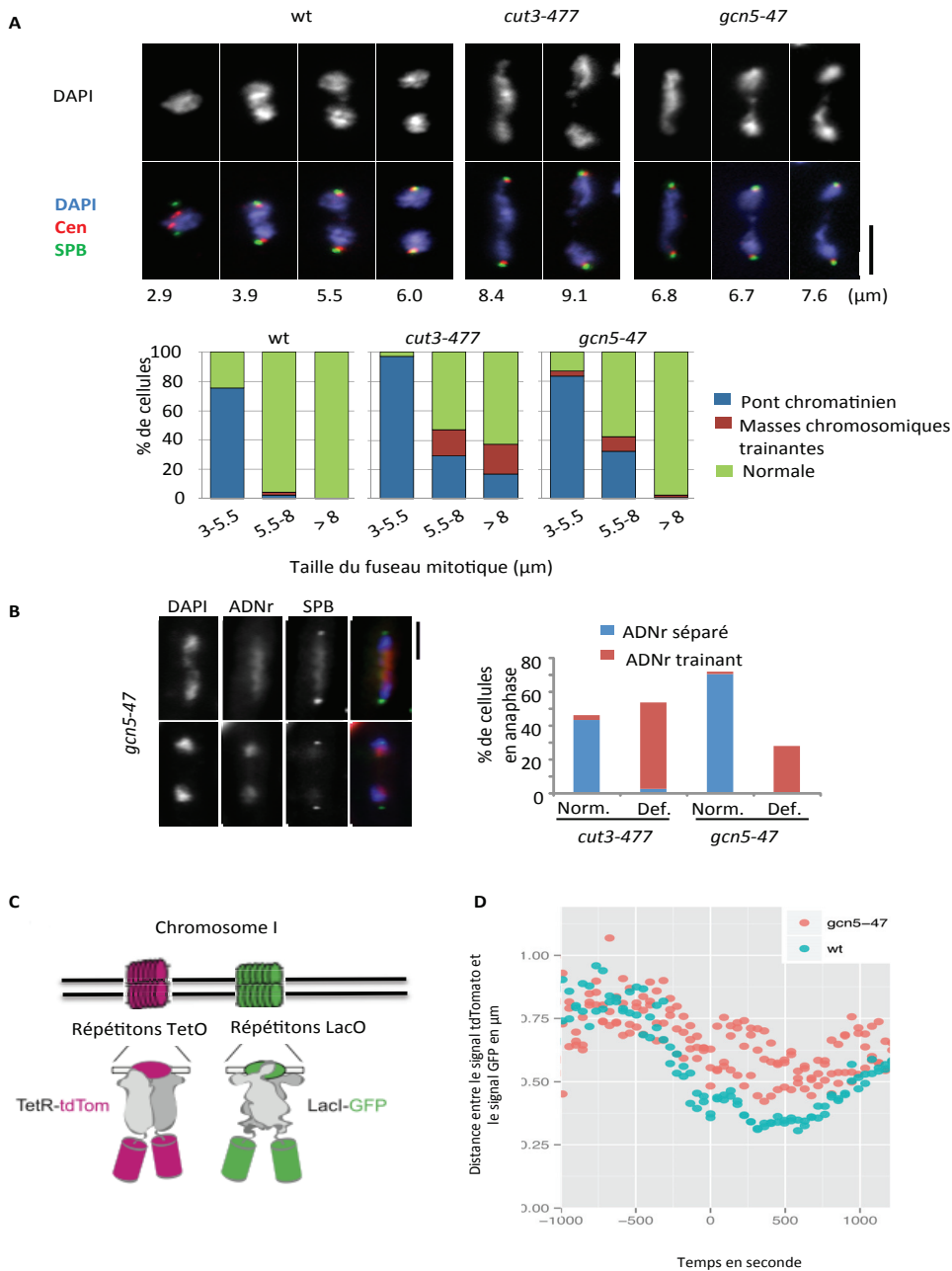


Figure 39 Le mutant *gcn5-47* présente des défauts de condensation des bras de chromosomes.

A. Ségrégation des centromères et des bras de chromosome en fonctions de la taille du fuseau. Les cellules sauvages, *cut3-477* ou *gcn5-47* cultivées en phase exponentielle de croissance en milieu complet à 32°C ont été traitées pour une immunofluorescence indirecte anti Cdc11-GPF (SPB) et anti Mis6-HA (cen) et les fréquences des défauts de ségrégations des chromosomes en fonction de la longueur du fuseau ont été déterminées. **B.** Ségrégation de l'ADNr détectée par la protéine Fib1-RFP chez les mutants *cut3-477* ou *gcn5-47* lors d'anaphases normales (Norm.) ou en présence de pont chromatinien (Def.). Les cellules exprimant Fib1-RFP et Cdc11-GFP ont été cultivées en phase exponentielle de croissance à 32°C, fixées et l'ADN a été coloré par une solution de DAPI pour visualiser la ségrégation des chromosomes $n > 70$. **C.** Schéma représentant la construction des souches pour les essais de condensation **D.** Essai de condensation sur les souches sauvages et *gcn5-47*. Le point zéro correspond au début de l'anaphase. Barre A-B : 5 microns.

ainsi un mini pont chromatinien transitoire. La présence des centromères aux pôles du fuseau mitotique est un marqueur cytologique de l'anaphase. La séparation des bras est achevée quand le fuseau mitotique atteint 5 à 6 microns.

Chez le mutant *cut3-477*, la condensation mitotique est altérée (Saka et al. 1994; Petrova et al. 2013). Les centromères rejoignent les pôles opposés mais les bras de chromosomes peinent à se séparer et forment des ponts chromatiniens (Figure 39A).

L'examen des cellules *gcn5-47* n'a révélé aucun défaut de migration des centromères vers les pôles opposés du fuseau en anaphase. En revanche, la séparation des bras de chromosomes est clairement retardée. Comme chez le mutant *cut3-477*, on observe des ponts chromatiniens et des trainées de bras de chromosomes sur le fuseau mitotique. Chez le mutant *gcn5-47*, la séparation complète des bras est fréquemment retardée au-delà de 6 microns, la longueur du fuseau pouvant atteindre 9 microns (Figure 39A). Ainsi, les résultats montrent que la mutation *gcn5-47* retarde la séparation des bras de chromosomes en anaphase mais aucun défaut de migration des centromères n'a été observé, ce qui suggère que la présence des ponts chromatiniens n'est pas le résultat d'une altération de fonctions centromériques. Il pourrait s'agir d'un défaut de condensation ou de résolution des chromatides sœurs.

Pour éprouver cette hypothèse j'ai visualisé directement les bras du chromosome III en anaphase dans les cellules mutantes *gcn5* (Figure 39B). Un défaut de condensation des bras de chromosomes entraîne leur étirement en anaphase causé par la migration des centromères vers les pôles du fuseau. La protéine Fib1 se fixe à l'ADN ribosomique situé sur les bras du chromosome III. En utilisant la protéine de fusion Fib1-RFP, j'ai montré que l'ADN ribosomique était anormalement étiré en anaphase dans les cellules mutantes *gcn5-47* et *cut3-477* (Figure 39B). Cet étirement ne peut résulter d'un défaut d'attachement des centromères.

L'ensemble de ces résultats suggère que Gcn5 est nécessaire à la condensation des bras de chromosomes en anaphase.

2. Essai de condensation chez le mutant *gcn5-47*

Une étude récente a permis de mettre place un essai de condensation chez *S. pombe* par analyses quantitatives (Petrova et al. 2013). L'essai consiste à réaliser une mesure tridimensionnelle de la distance entre deux régions d'un même chromosome au cours de

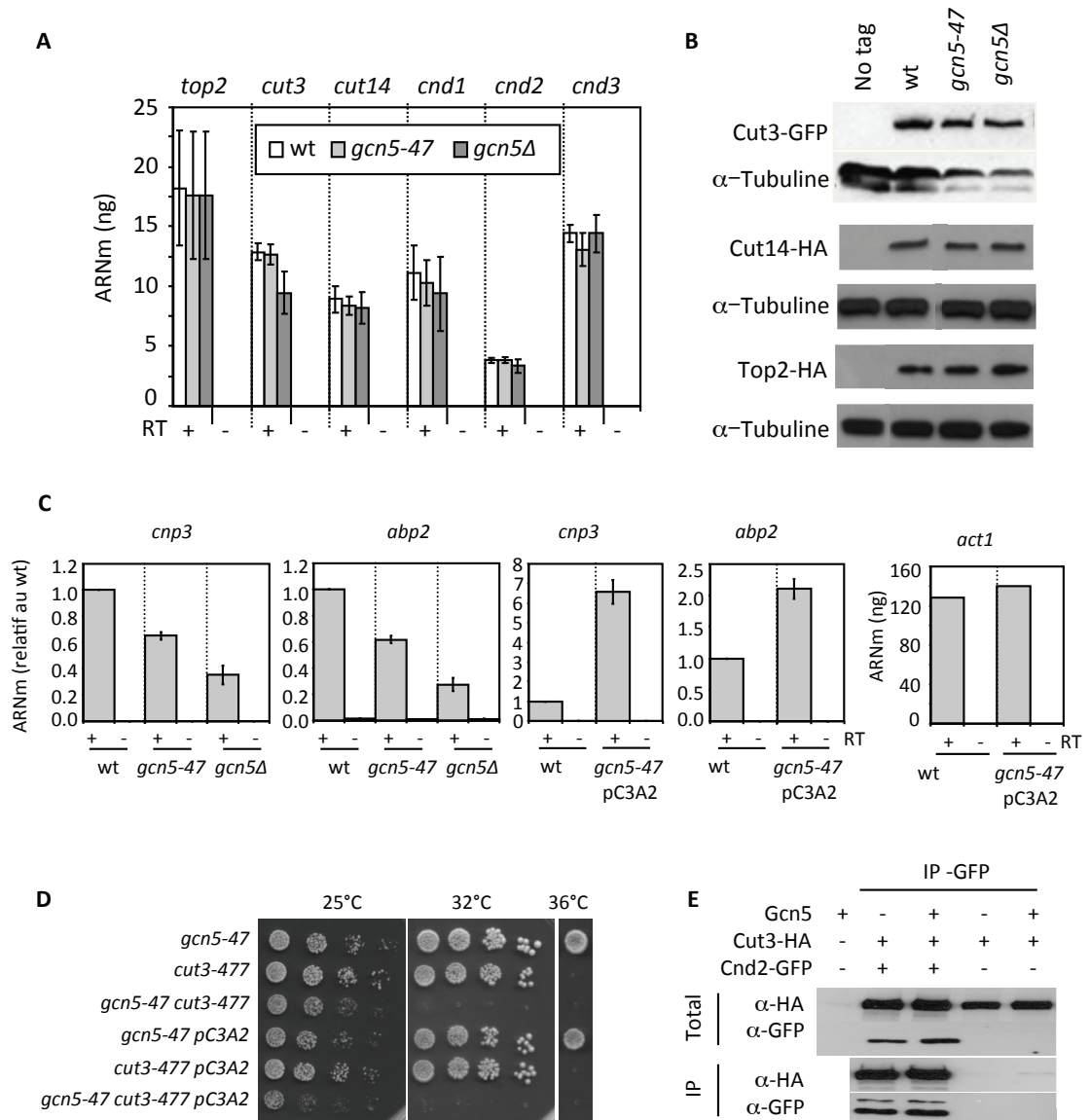


Figure 40. L'interaction fonctionnelle entre Gcn5 et Cut3 est directe

A. Niveaux à l'équilibre des ARNm des sous unités de condensine et de la topo II normalisés par rapport au niveau d'*act1*. **B.** Niveaux protéiques à l'équilibre de Cut3, Cut14 et Top2 chez les mutants *gcn5* et la souche sauvage. **C.** Les niveaux d'expression des gènes *cnp3* et *abp2* mesurés par RT-qPCR. pC3A2 indique la présence du plasmide FYG149_021, portant les gènes *cnp3* et *abp2*, inseré dans le génome. **D.** La présence du plasmide pFYG146_021 (pC3A2) dans la souche *gcn5-47 cut3-477* ne restaure pas sa croissance à 32°C. **E.** Co-immunoprécipitation de Cut3-HA et Cnd2-GFP en présence ou l'absence de *gcn5*.

la mitose sur des cellules vivantes. Les auteurs insèrent des répétitions TetO (tetracyclin operator) et LacO (lactose operator) au niveau de deux régions du chromosome I (le plus long des 3 chromosomes de *S. pombe*) distantes d'au moins 0,1 Mb et les suivent par marquage de l'expression simultanée des répresseurs LacI-GFP et TetR-tdTomato (tandem tomato) (Figure 39C). Les auteurs synchronisent les cellules en G2, filment les cellules entrant en mitose, puis calculent la distance entre les deux signaux vert (GFP) et rouge (tdTomato).

Afin de confirmer que les phénotypes observés chez le mutant *gcn5-47* résultent d'un défaut de condensation, nous avons réalisé en collaboration avec l'équipe C. Hearing un essai de condensation sur la souche *gcn5-47* et la souche sauvage (Figure 39D). Les marqueurs utilisés sont placés sur le bras du chromosome I et séparés par 1 Mb d'ADN. Les résultats montrent que chez un mutant *gcn5-47*, comme chez un mutant *cut3-477* ou *cut14-208* (Petrova et al. 2013), la distance entre les marqueurs chromosomiques GFP et tdTomato est globalement augmentée par rapport au sauvage tout au long de l'anaphase. Ces données montrent que la protéine Gcn5 est nécessaire à la condensation longitudinale des bras de chromosome en anaphase.

C. Interaction entre *gcn5* et *cut3* est spécifique

1. Expression des gènes de condensation dans les mutants *gcn5*

L'implication de Gcn5 dans la transcription pose la question de la spécificité du rôle de Gcn5 dans la condensation mitotique des chromosomes. Le défaut de condensation observé quand Gcn5 est déficiente reflète-t-il un rôle direct ou la conséquence indirecte d'un défaut de transcription d'un authentique gène de condensation ?

L'analyse du transcriptome par puce à ADN a montré que la mutation *gcn5Δ* altère l'expression de seulement 1% des gènes chez *S. pombe*, et la majorité de ces gènes affectés est impliquée dans la méiose (Helmlinger et al. 2008). J'ai vérifié qu'aucun gène de condensation connu n'est présent parmi les 57 gènes affectés en l'absence de Gcn5. Puis j'ai confirmé par RT-qPCR que les niveaux d'expression des gènes codant les sous unités de condensine et du gène *top2* (codant topo II) ne sont pas modifiés chez le mutant *gcn5-47* (Figure 40A). Concernant le mutant *gcn5Δ*, le niveau des ARNm *cut3* est très légèrement diminué, en accord avec les données de Helmlinger et al. (Helmlinger et

al. 2008). Cependant, les niveaux protéiques à l'équilibre des protéines Cut3, Cut14 et Top2 ne sont diminués ni dans le mutant *gcn5Δ* ni dans le mutant *gcn5-47* (Figure 40B). L'ensemble de ces données suggère que les effets synthétiques létaux entre *gcn5-47* et *cut3-477*, et *gcn5Δ* et *cut3-477*, ne sont pas dus à un effet indirect d'une altération de l'expression des gènes de condensation.

2. Expression de *cnp3* et *abp2*

Helmlinger et al montrent que l'expression des gènes *cnp3* et *abp2* est fortement réduite dans un mutant *gcn5Δ*. Cnp3 est une protéine centromérique, homologue de CENP-C (Yokobayashi et Watanabe 2005) et Abp2 est une protéine impliquée dans l'initiation de la réplication de l'ADN mais également présente au niveau des SBP durant la mitose (Matsuyama et al. 2006). J'ai confirmé par RT-qPCR la moindre expression des gènes *cnp3* et *abp2* chez les mutants *gcn5-47* et *gcn5Δ* (Figure 40C). Nous avons voulu nous assurer que la colétalité entre *gcn5Δ* et *cut3-477* n'était pas due à une diminution de l'expression de *cnp3* et/ou *abp2*. Pour cela, j'ai transformé la souche simple mutante *gcn5-47* avec le plasmide FYG149_021 portant les gènes *cnp3* et *abp2* (renommé pC3A2 pour plasmide *cnp3-abp2*) dans le but de rectifier la déficience en ARNm *cnp3* et *abp2*. J'ai vérifié par RT-qPCR que le niveau d'expression de ces deux gènes est restauré dans une souche *gcn5-47* portant le plasmide FYG149_021 (Figure 40C). Les résultats ont montré que le plasmide FYG149_021 inséré dans la souche double mutante *gcn5-47 cut3-477* ne permet pas la restauration de la croissance à 32°C, alors que les simples mutants sont viables (malgré la surexpression du gène *cnp3*) (Figure 40D). Ceci suggère que la colétalité entre *gcn5Δ* et *cut3-477* ne dépend pas du niveau d'expression réduit des gènes *cnp3* et *abp2*.

3. Intégrité du complexe condensine dans le mutant *gcn5Δ*

Afin de déterminer si Gcn5 affectait l'intégrité du complexe condensine, une expérience de co-immunoprécipitation (co-IP) entre Cut3-HA et Cnd2-GFP a été réalisée. Les résultats montrent que les deux protéines co-immunoprécipitent efficacement dans un fond génétique *gcn5Δ* et aucune différence n'a été observée avec le contrôle sauvage

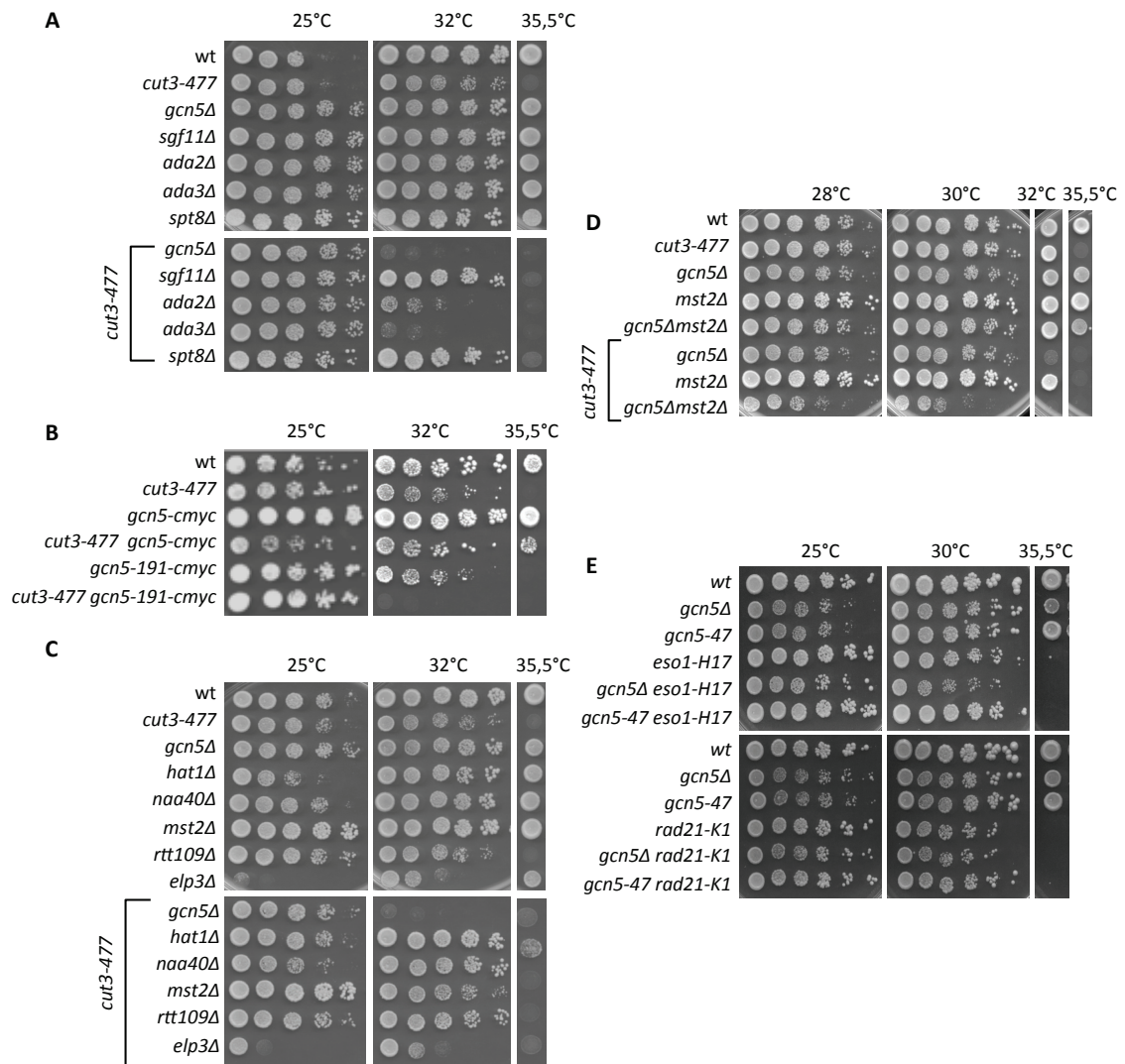


Figure 41. L'interaction entre Cut3 et Gcn5 est spécifique.

A. Seule la délétion des gènes codant les sous unités du module HAT est colétale avec *cut3-477* **B.** La mutation *gcn5-191*, qui réduit l'activité AT (acétyl-transférase) de Gcn5 est colétale avec *cut3-477*. **C.** Parmi six histones acétyl-transférase répertoriées chez *S. pombe*, seule la perte de Gcn5 est colétale avec *cut3-477*. **D.** Les mutants de *gcn5* ne sont pas hypersensibles à une altération de la cohésion des chromatides sœurs.

(Figure 40E), suggérant que l'intégrité du complexe condensine n'est pas dépendante de Gcn5.

4. Interactions génétiques entre les sous unités du complexe SAGA et *cut3-477*

La protéine Gcn5 est la sous unité catalytique du complexe SAGA, lequel est constitué des modules HAT, TAF, DUB et Tra1, structurellement et fonctionnellement distincts (Nagy et Tora 2007). Afin de préciser la nature de l'interaction fonctionnelle entre Gcn5 et Cut3/condensine, nous avons testé des mutations représentatives de chacun des modules pour une interaction colétale avec *cut3-477* à 32°C. Ni *spt8Δ* (module TBP), ni *sgf11Δ* (module déubiquitylase), ni *tra1Δ* (module Tra1) ne sont colétales avec *cut3-477* (Figure 41A et données non-montrées). En revanche la délétion du gène *ada2* ou *ada3*, lesquels codent des sous unités régulatrices de Gcn5 au sein du module HAT, est colétale avec *cut3-477* (Figure 41A). L'ensemble de ces résultats suggère que l'interaction fonctionnelle entre Gcn5 et Cut3 concerne le module HAT du complexe SAGA.

Les résultats précédents suggèrent un lien entre Gcn5, l'activité HAT de SAGA, et condensine. Si tel est le cas, alors la mutation *gcn5-191*, qui rend Gcn5 catalytiquement inactive sans l'éliminer (Helmlinger et al. 2008), devrait être colétale avec *cut3-477*. Les résultats, en accord avec les résultats précédents, montrent une interaction synthétique létale entre *gcn5-191* et *cut3-477* à 32°C (Figure 41B). L'ensemble de ces résultats suggère que l'interaction fonctionnelle entre Gcn5 et Condensine implique l'activité acétyltransférase de Gcn5, Ada2 et Ada3.

5. Spécificité de l'interaction fonctionnelle entre Gcn5 et Cut3/condensine

Les protéines HATs Elp3 et Mst2 sont fonctionnellement redondantes avec Gcn5 vis-à-vis de la régulation de la transcription (Nugent et al. 2010). Cependant, ni *elp3Δ*, ni *mst2Δ*, ni trois autres HATs testées, *hat1Δ*, *naa40Δ* et *rtt109Δ*, ne sont colétales avec *cut3-477* (Figure 41C). Ces résultats suggèrent que l'interaction fonctionnelle entre Gcn5 et Cut3/condensine est spécifique.

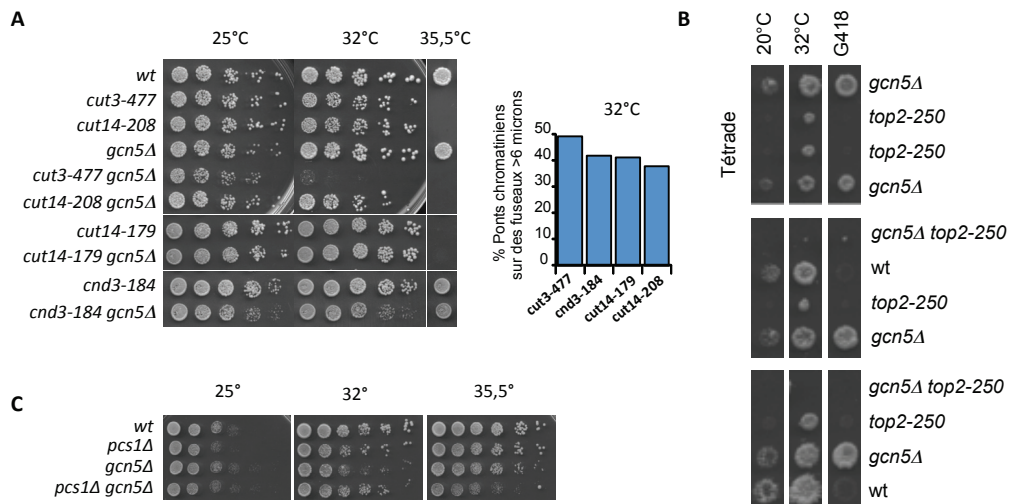


Figure 42. Interactions génétiques entre *gcn5* et les gènes codant des facteurs de condensation.

A. Seule la mutation *cut3-477* est colétale avec *gcn5Δ* à 32°C (Panneau de droite). Le pourcentage de ponts chromatiniens en anaphase a été mesuré dans chacun des simples mutants de condensine, cultivés en phase exponentielle de croissance à 32°C, par immunofluorescence indirecte de la tubuline et une coloration de l'ADN au DAPI. n=50 cellules en anaphase dont le fuseau mitotique est supérieur à 6 microns. **B.** Analyse de tétrades issues du croisement entre la souche *gcn5Δ::kanMX6* et la cryosensible *top2-250*. Le panneau du haut représente un ditype parental, et les deux panneau du dessous représentent deux tétratypés. **C.** La mutation *pcs1Δ* a un effet synthétiquement négative avec *gcn5Δ* à 35,5°C

Mst2 pourrait partiellement compenser l'absence de Gcn5 (Nugent et al. 2010), et atténuer la défaillance de condensation mitotique des chromosomes causée par la mutation *gcn5Δ*. Pour tester cela, j'ai examiné la croissance de la souche triple mutante *gcn5Δ mst2Δ cut3-477* (Figure 41D). L'absence de Mst2 durcit nettement l'interaction synthétique négative entre *gcn5Δ* et *cut3-477* puisque l'interaction synthétique négative se manifeste dès 30°C. Ce résultat suggère que Mst2 pourrait contribuer à la condensation des chromosomes de façon partiellement redondante avec Gcn5.

L'interaction létale entre *gcn5Δ* et *cut3-477* pourrait traduire une hypersensibilité du mutant *gcn5* à tout défaut dans l'organisation globale des chromosomes, plutôt qu'à une seule altération de la condensation. Pour tester cette hypothèse, j'ai confronté la souche *gcn5Δ* à une déficience de cohésion des chromatides sœurs en utilisant les mutations *rad21-K1* (Tatebayashi, Kato, et Ikeda 1998) et *eso1-H17* (K. Tanaka et al. 2000). Ces mutations sont connues pour altérer sévèrement la cohésion des chromatides sœurs. L'absence de Gcn5 ne confère aucune sensibilité à la déficience de Rad21 ou d'Eso1 (Figure 41E). La déficience de Gcn5 ne cause donc pas de sensibilité aveugle à tout type de défaut d'organisation des chromosomes. Ces résultats sont cohérents avec un rôle spécifique de Gcn5 dans la condensation mitotique des chromosomes.

6. Interaction fonctionnelle entre Gcn5 et d'autres protéines de condensation

Pour tenter de préciser le rôle de Gcn5 dans la condensation, j'ai testé la mutation *gcn5Δ* pour des interactions génétiques avec d'autres sous unités de condensine et/ou avec Top2.

La mutation *gcn5Δ* n'est pas colétale avec *cut14-208* (S861P) ou *cut14-179* (T652M) ou *cnd3-184* (E195K) (Figure 42A). En revanche, on peut noter une interaction génétique négative entre *gcn5Δ* et *cnd3-184*. Les fréquences des ponts chromatiniens mesurées à 32°C chez ces trois mutants de condensine sont légèrement inférieures à celle du mutant *cut3-477* (*cut14-208* : 38% ; *cut14-179* : 41% ; *cnd3-184* : 41% ; *cut3-477* : 49%) (Figure 42A, panneau de droite), suggérant que ces mutations affectent la condensation mitotique avec des pénétrances moindres que celle de *cut3-477*. Ces résultats suggèrent une interaction fonctionnelle étroite entre Gcn5 et la sous unité Smc4/Cut3 du complexe

condensine, ou, alors, Gcn5 ne devient essentielle à la viabilité cellulaire qu'au delà d'un certain de seuil de dysfonctionnement de condensine, atteint chez le mutant *cut3-477* à 32°C.

La souche mutante *gcn5-47* présente des anomalies en anaphase qui pourraient s'expliquer par un défaut de décaténation des chromatides sœurs. Top2 est nécessaire à cette réaction et la mutation *top2-250* qui réduit l'activité catalytique de Top2 est colétale avec *cut3-477* (Saka et al. 1994). La mutation *gcn5-47* pourrait donc réduire l'activité de Top2 sur les chromosomes. En accord avec cette hypothèse, *gcn5-47* est colétale avec *top2-250* (Figure 42B). Alternativement, la colétalité entre *top2-250* et *gcn5Δ* pourrait traduire un dysfonctionnement de condensine en l'absence de Gcn5.

La protéine Pcs1 recrute condensine au centromère et au niveau de l'ADNr (Tada et al. 2011) et la mutation *pcs1Δ* est colétale avec *cut3-477*, comme *gcn5Δ*. Gcn5 pourrait donc fonctionner dans la voie de chargement des condensines impliquant Pcs1. Si tel était le cas, il pourrait ne pas y avoir d'effet additif entre les mutations *gcn5Δ* et *pcs1Δ*. Les résultats montrent que ce n'est pas le cas, j'ai observé un effet synthétique négatif entre les mutations *gcn5Δ* et *pcs1Δ* à 36°C (Figure 42C), suggérant que Gcn5 et Pcs1 fonctionneraient, au moins en partie, dans des voies séparées.

L'ensemble de ces résultats implique l'existence d'une interaction fonctionnelle étroite entre Gcn5, condensine et/ou topo II, et conforte l'idée d'un rôle pertinent, direct, pour Gcn5 dans la condensation mitotique des chromosomes.

D. Gcn5 assiste la fixation de condensine à la chromatine

Afin de déterminer si Gcn5 contribue ou non à l'association de condensine à la chromatine, nous avons utilisé deux méthodes complémentaires : la technique de d'étalement de la chromatine (chromosome spreads) qui permet de mesurer par immunofluorescence indirecte la quantité totale de condensine associée à la chromatine après étalement des noyaux sur une lame de verre, et la technique d'immunoprécipitation de la chromatine (ChIP) qui permet de mesurer la quantité de condensine associée à la chromatine en des sites précis du génome.

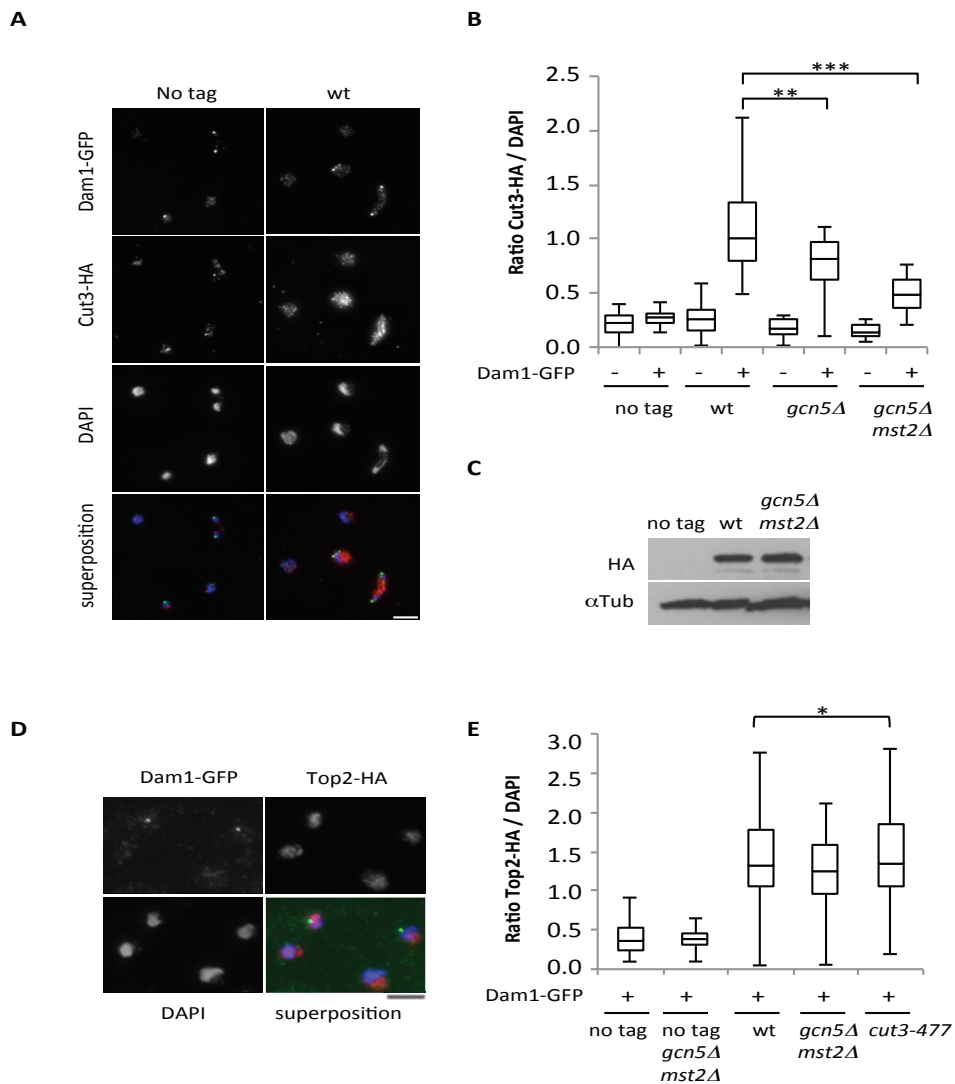


Figure 43. Gcn5 et Mst2 sont requises à l'association de condensine aux chromosomes mitotiques

A. Chromosomes étalés à partir de cellules sauvages *cut3-HA dam1-GFP* cultivées en phase exponentielle de croissance à 32°C suivi d'un immunomarquage contre GFP et HA. Les signaux Dam1-GFP identifient la chromatine mitotique. Barre : 5 microns. **B.** L'association de Cut3-HA à la chromatine mitotique (dam+) ou interphasique (dam-) a été mesurée par étalement de chromosomes. ($p < 0,001$, test U) $n = 30$. Les rectangles (*boxes*) correspondent aux valeurs réparties dans l'interquartile entre le 1^e et 3^e quartiles et la médiane (valeur du 2^e quartile), les « moustaches » (*whiskers*) correspondent aux valeurs minimum et maximum. Les valeurs sont issues de 5 expériences indépendantes, chacune est normalisée par rapport à la valeur de médiane de la population des chromosomes issus de cellules sauvages en mitose (dam+) qui est propre à chacune des expériences. **C.** Le niveau protéique à l'équilibre de Cut3-HA chez le mutant *gcn5Δ mst2Δ* a été déterminé par western blotting. L' α -tubuline sert de contrôle de chargement. **D.** Chromosomes étalés à partir de cellules sauvages *top2-HA dam1-GFP* cultivées en phase exponentielle de croissance à 32°C suivi d'un immunomarquage contre GFP et HA. Barre : 5 microns. **E.** L'association de Top2 à la chromatine mitotique (Dam1-GFP positive) a été mesurée par étalement de chromosomes ($*p > 0,05$, test U) $n = 30$. Les valeurs sont issues de 3 expériences indépendantes, chacune est normalisée par rapport à la valeur de médiane de la population des chromosomes issus de cellules sauvages en interphase (dam-) qui est propre à chacune des expériences.

1. Association de condensine à la chromatine dans les mutants *gcn5* par chromosome spreads

Condensine fixe les chromosomes en mitose. Pour mesurer par immunofluorescence indirecte la fixation pan-génomique de condensine à la chromatine après étalement des chromosomes sur une lame de verre il est nécessaire de pouvoir identifier les chromosomes mitotiques. La protéine Dam1-GFP, recrutée au niveau des kinétochores spécifiquement en mitose (X. Liu et al. 2005), a été utilisée comme marqueur mitotique. Les noyaux de cellules *dam1-GFP cut3-HA* ont été étalés sur lame de verre et la quantité de protéine Cut3-HA associée à la chromatine mitotique (Dam1-GFP positive) ou interphasique (Dam1-GFP négative) a été mesurée. J'ai observé des signaux Cut3-HA intenses au niveau des chromosomes décorés par Dam1-GFP, et, au contraire un marquage Cut3-HA faible au niveau des chromosomes dépourvus de Dam1-GFP (Figure 43A), reflétant le recrutement massif de condensine sur la chromatine en mitose. L'examen des chromosomes extraits des cellules mutantes a montré que la quantité globale de Cut3-HA associée à la chromatine est réduite d'environ 20% dans un fond génétique *gcn5Δ* et de 50% chez le double mutant *mst2Δ gcn5Δ* (Figure 43A). Notez cependant que la quantité de protéine Cut3-HA n'est pas réduite dans les cellules mutantes *mst2Δ gcn5Δ* (Figure 43B). Ces résultats indiquent donc une diminution significative de l'association de condensine à la chromatine en l'absence de Gcn5.

Afin de d'éprouver la spécificité du lien entre Condensine et Gcn5, j'ai mesuré l'association de topo II à la chromatine en l'absence de Gcn5 par la même approche expérimentale. La souche mutante *cut3-477* a été utilisée comme contrôle pour un lien éventuel entre une moindre association de condensine et la localisation de topo II sur la chromatine. Comme indiquée dans la figure 43E, l'association de Top2-HA à la chromatine n'est pas significativement modifiée en mitose en l'absence de Gcn5 et Mst2, ou en l'absence de condensine fonctionnelle. L'effet de Gcn5 sur la localisation chromosomique de condensine semble donc spécifique.

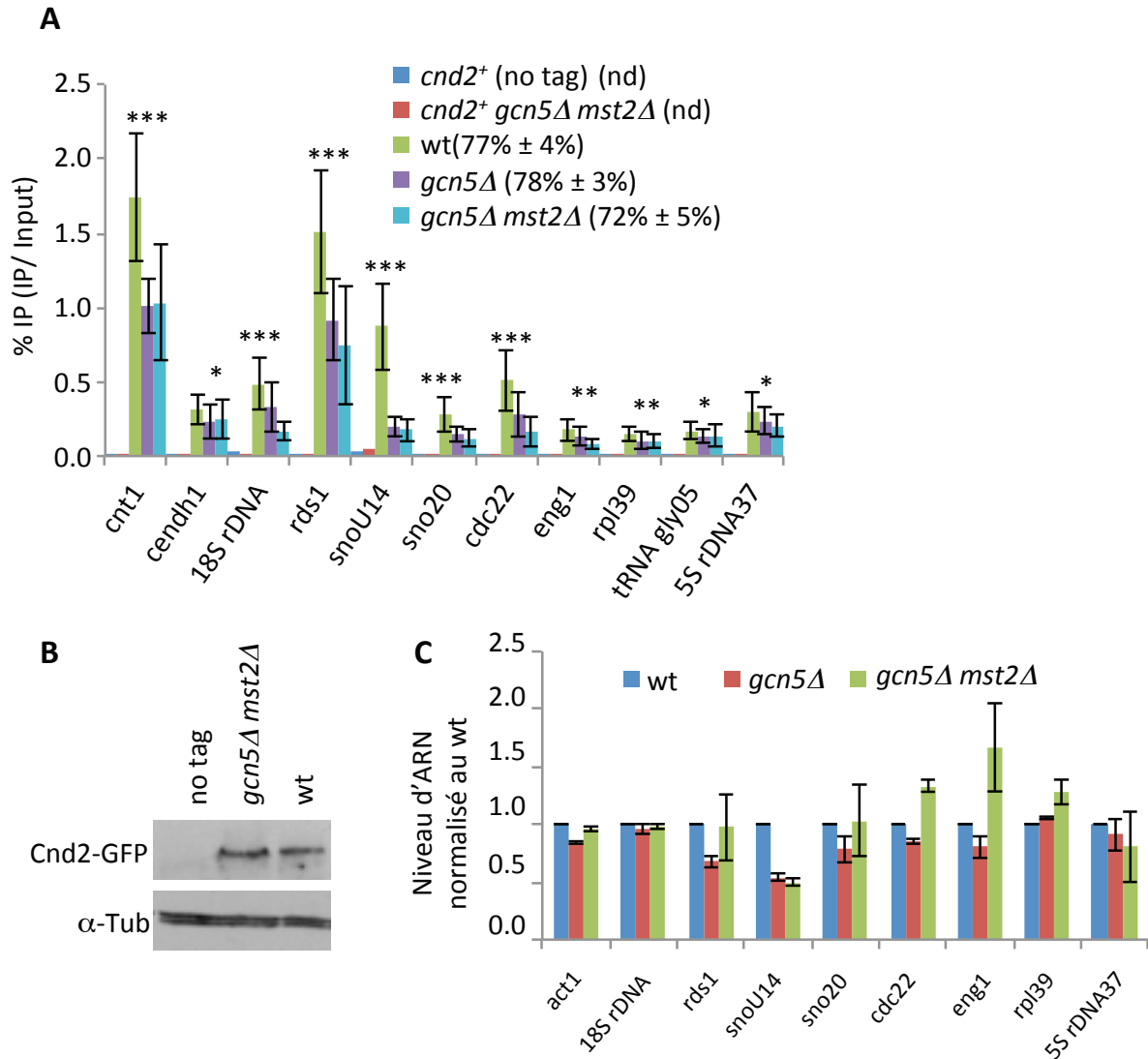


Figure 44 Gcn5 est requise à l'association de condensine aux gènes de classe I et de classe II.

A. Les cellules ont été cultivées à 32°C en phase exponentielle de croissance puis synchronisées par un arrêt *nda3-KM311* 7h à 17°C. Entre parenthèse est indiqué le pourcentage de cellules mitotiques, basé sur l'accumulation de Cnd2-GFP dans le noyau (nd pour non déterminé) $n=100 \times 3$ expériences. Le ChIP a été réalisé contre Cnd2-GFP sur ces cellules synchronisées en prométaphase, les valeurs de % d'IP représentent les moyennes et écarts moyens calculés à partir de 3 expériences indépendantes, chacune réalisée en duplicat. (* $P>0,05$, ** $P<0,05$, *** $P<0,01$, test U)

B. Le niveau protéique à l'équilibre de Cnd2-GFP chez le mutant *gcn5Δmst2Δ* a été déterminé par western blotting. L' α -tubuline sert de contrôle de chargement.

C. Niveaux à l'équilibre des ARNm des gènes que nous avons testé pour l'association de condensine à la chromatine. Les valeurs indiquées correspondent aux moyennes et écarts moyens calculés à partir de 2 expériences.

2. Association de condensine à la chromatine dans les mutants *gcn5* par ChIP suivi de qPCR sur cellules synchronisées en prométaphase par arrêt *nda3-KM311*

Pour déterminer où sur les chromosomes Gcn5 facilitait l'association de condensine à la chromatine j'ai employée la technique d'immunoprécipitation de la chromatine (ChIP) en utilisant un anticorps dirigé contre la sous unité Cnd2-GFP de condensine. Les cellules ont été bloquées en prométaphase avec la mutation *nda3-KM311*, et la chromatine co-immunoprécipitée avec Cnd2-GFP a été analysée par qPCR. La qualité des arrêts mitotique a été déterminée en mesurant le pourcentage de cellules montrant une accumulation de Cnd2-GFP dans le volume nucléaire (Figure 44A). Les résultats montrent une association réduite de Cnd2-GFP au niveau du domaine central du centromère, et, le long des bras de chromosome, au niveau de plusieurs gènes de classe II en l'absence de Gcn5 (Figure 44A). L'association de Cnd2-GFP est également réduite au niveau de l'ADNr (classe I), mais reste inchangée au niveau des gènes de classe III codant l'ARNt Gly05 et l'ARNr 5S. L'absence combinée de Gcn5 et Mst2 réduit un peu plus le niveau d'association de Cnd2-GFP, tandis que le niveau à l'équilibre de protéine Cnd2-GFP reste inchangé (Figure 44B), corroborant les résultats obtenus par étalement de chromatine. La transcription s'opposant à la fixation des condensines (Andrés Clemente-Blanco et al. 2009; Andres Clemente-Blanco et al. 2011), nous avons mesuré par RT-qPCR les niveaux d'expression des sites de fixation de condensine en l'absence de Gcn5 et de Mst2. Certains sont diminués (*rds1*, *snoU14*), d'autres sont augmentés (*cdc22*, *eng1*, *rpl39*) ou inchangés (*sno20*, *18S*) (Figure 44C). La moindre association de Cnd2-GFP en l'absence de Gcn5 n'est donc pas la conséquence d'une transcription accrue des sites de fixation chromosomiques. L'ensemble de ces résultats indique un rôle pour Gcn5 dans l'association de condensine à la chromatine au niveau de certains sites mais pas tous. Gcn5 prendrait part à la localisation de condensine aux gènes de classe II, de classe I et non de classe III.

Les expériences décrites dans la Figure 44 ont été réalisées en collaboration avec Esther Mollereau qui est technicienne CNRS dans l'équipe.

3. Gcn5 ne semble pas interagir avec condensine en prométaphase

Afin de déterminer si l'interaction génétique entre condensine et Gcn5 traduit une interaction physique, j'ai réalisé une expérience de co-IP entre les protéines Gcn5-cMyc et Cut3-GFP, d'une part, et entre Gcn5-191-cMyc (catalytiquement inactive) et Cut3-GFP, d'autre part. Les protéines ont été extraites de cellules arrêtées en prométaphase. Les résultats obtenus n'ont pas révélé d'interaction. Il est cependant possible que l'interaction entre Gcn5 et condensine soit très transitoire (acétylation de condensine) et/ou qu'elle est lieu en anaphase, ou bien qu'elle ne soit visible qu'avec Cut14-GFP. Ces possibilités restent à être adressées par des expériences complémentaires.

III- Rôle de Gcn5 dans la condensation mitotique des chromosomes

Nos résultats indiquent que Gcn5 interagit fonctionnellement et spécifiquement avec Condensine. L'interaction entre *cut3* et *gcn5* est spécifique, Gcn5 lui même a un rôle dans la condensation mitotique des chromosomes et ceux via son activité acétyl-transférase. Sachant que Gcn5 est capable d'acétyler des protéines non histones, nous avons à ce stade au moins 2 possibilités mutuelles non exclusives envisageables:

- Acétylation d'une sous unité de condensine par Gcn5,
- ou/et rôle de Gcn5 via son activité HAT sur les nucléosomes.

Des acétyl-lysines ont été détectées dans les protéines Cut3/Smc4 et Cut14/Smc2, et Gcn5 peut acétyler des protéines non-histones (Cai et al. 2011; Paolinelli et al. 2009; J.-H. Kim et al. 2010). Il est donc possible que la fonction de Gcn5 dans la condensation soit d'acétyler Cut3 et/ou Cut14.

Chez *S. pombe* comme chez *S. cerevisiae*, Gcn5 acétyle principalement les résidus K9 et K14 de l'histone H3 (Nugent et al. 2010; Robert et al. 2004; Xhemalce et Kouzarides 2010), et la quantité de Gcn5 présente au niveau des promoteurs des gènes est fonction du niveau d'expression de ces derniers. On pourrait donc s'attendre à ce que les sites de fixation de condensine, qui sont proches de gènes fortement transcrits soit également proches de sites enrichies en histone H3 acétylées au niveau des résidus K9 et/ou K14.

L'acétylation de l'histone H3 par Gcn5 pourrait jouer un rôle dans l'association de condensine à la chromatine.

J'ai cherché à déterminer le mécanisme par lequel Gcn5 assiste la fixation de Condensine. Si Gcn5 est nécessaire à l'acétylation de condensine, alors les mutants non acétylables doivent phénotyper le mutant *gcn5Δ*. L'examen de ces cellules mutantes devrait nous indiquer de façon fiable laquelle des deux hypothèses est à privilégier, idem pour la sous unité cut3.

A. Gcn5 ne semble pas être responsable de l'acétylation de la lysine K114 de Cut14 ou des lysines K348 et K1069 de Cut3

1. Données sur les sites lysines acétylées des sous unité SMC

L'analyse de l'acétylome de *S. pombe* a révélé que la sous-unité Cut3/Smc4 est acétylée au niveau des lysines K348 et K1069 (Javerzat JP, communication personnelle). hSmc4, l'homologue humain de Cut3, est également acétylée (Bazile, St-Pierre, et D'Amours 2010). La séquence primaire des sites d'acétylation de Cut3 n'est pas conservée chez hSmc4, mais la position relative des acétyl-lysines, notamment K1069, est conservée (Figure 46A), suggérant un rôle important pour cette modification dans le fonctionnement de condensine.

L'analyse de l'acétylome humain a montré que l'homologue humain de Cut14 (hSmc2) est acétylée au niveau de la lysine K114 (Choudhary et al. 2009). La lysine K114 de hSmc2 est extrêmement conservée au cours de l'évolution, y compris dans Cut14 (Figure 46A). De plus, la position de la lysine K114 par rapport au site de fixation de l'ATP dans Cut14/Smc2 correspond parfaitement à la position de la lysine K112 dans la protéine Smc3 du complexe cohésine (Figure 46B). Or, l'acétylation de Smc3-K112 par Eso1/Eco1 en phase S stabilise l'interaction cohésine/chromatine et engage les anneaux de cohésine dans la cohésion. Ces observations suggèrent donc que la lysine K114 de Cut14/Smc2 serait conservée parce que son acétylation stabiliserait l'interaction de condensine avec la chromatine pendant la mitose. Aucune acétylation n'a été détectée

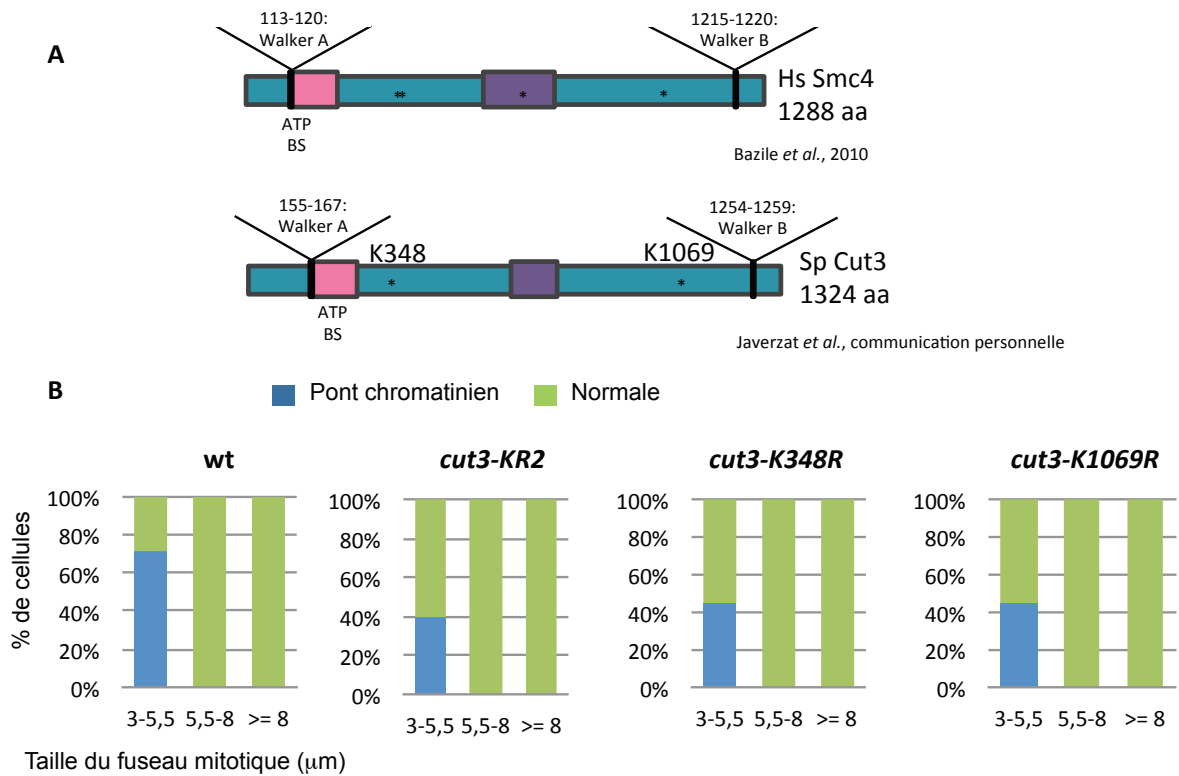


Figure 45. Analyses des mutants non acétylables de Cut3.

A. Structure de Smc4 et Cut3, les étoiles représentent les sites de résidus lysines acétylables. **B.** La ségrégation des chromosomes en anaphase n'est pas altérée dans les mutants non acétylables de *cut3*, *cut3. KR2* correspond à l'association des deux résidus non acétylables K348R et K1069R (n=100). Les cellules sauvages ou mutantes *cut3* ont été cultivées en phase exponentielle de croissance à 32°C Les cellules ont été ensuite traitées pour une immunofluorescence indirecte anti alpha-tubuline. La migration de la chromatine est suivie par une coloration au DAPI.

pour Cut14, mais ceci peut s'expliquer par le fait que l'analyse de l'acétylome de *S. pombe* a été réalisée à partir d'extraits de cellules asynchrones, et non uniquement mitotiques.. Afin de déterminer si Gcn5 est nécessaire ou non à l'acétylation Cut3 ou Cut14, j'ai immunoprécipité les protéines Cut3-GFP ou Cut14-HA à partir de cellules sauvages, *gcn5Δ* ou *gcn5-47*, asynchrones ou arrêtés en prométaphase, et recherché la présence d'acétyl-lysine par Western blot en utilisant des anticorps anti acétyl-lysine génériques (Abcam 21623, ICP0380). Malheureusement, cette approche n'a jamais fourni de signal positif, ni pour Cut3, ni pour Cut14. Face à cet échec, j'ai changé de stratégie. Si le rôle de Gcn5 est d'acétyler Cut3 ou Cut14, alors le mutant *cut3* non-acétylable, ou le mutant *cut14* non-acétylable, doit phénotypier le mutant *gcn5Δ*.

2. Construction et analyses des mutants non acétylables de *cut3*

J'ai entrepris la construction des souches mutantes *cut3* non acétylables *cut3-K348R*, *cut3-K1069R* et *cut3-KR2* où les deux résidus lysines sont remplacés par des arginines. L'examen des chromosomes dans ces souches mutantes devrait permettre de déterminer le rôle de l'acétylation dans la condensation mitotique.

Le gène *cut3* est essentiel à la viabilité cellulaire. Pour obtenir les souches mutantes *cut3* non-acétylables nous avons transformé une souche diploïde *cut3⁺/cut3Δ::ura4⁺* avec les plasmides *p-cut3K348R-LEU2*, *p-cut3K1069R-LEU2* et *p-cut3KR2-LEU2*, préalablement linéarisés de façon à ce qu'ils s'intègrent en aval du locus *cut3*. Des diploïdes Ura⁺ Leu⁺ ont été sélectionnés et l'intégration correcte de chacun des plasmides a été vérifiée par PCR. Mes résultats indiquent que les souches diploïdes ainsi transformées génèrent par sporulation des descendants haploïdes *cut3Δ::ura4⁺ cut3-K348R-LEU2*, *cut3Δ::ura4⁺ cut3-K1069R-LEU2* et *cut3Δ::ura4⁺ cut3-KR2-LEU2* viables, indiquant que les trois mutations non-acétylables de *cut3* ne sont pas létales.

Les phénotypes des mutants *cut3* non-acétylables ont été recherchés. En premier lieu, la condensation des chromosomes a été évaluée par analyse cytologique. La présence de ponts chromatiniens est un indicateur fort d'un défaut de condensation. Si Gcn5 acétyle Cut3, on peut espérer observer un défaut de séparation des bras de chromosomes similaire à celui montré par le mutant *gcn5-47*. L'examen cytologique des cellules mutantes n'a révélé aucun pont chromatinien en anaphase (Figure 45B), indiquant que l'acétylation de Cut3 au niveau des lysines K348 et K1069 n'a pas de rôle majeur dans la

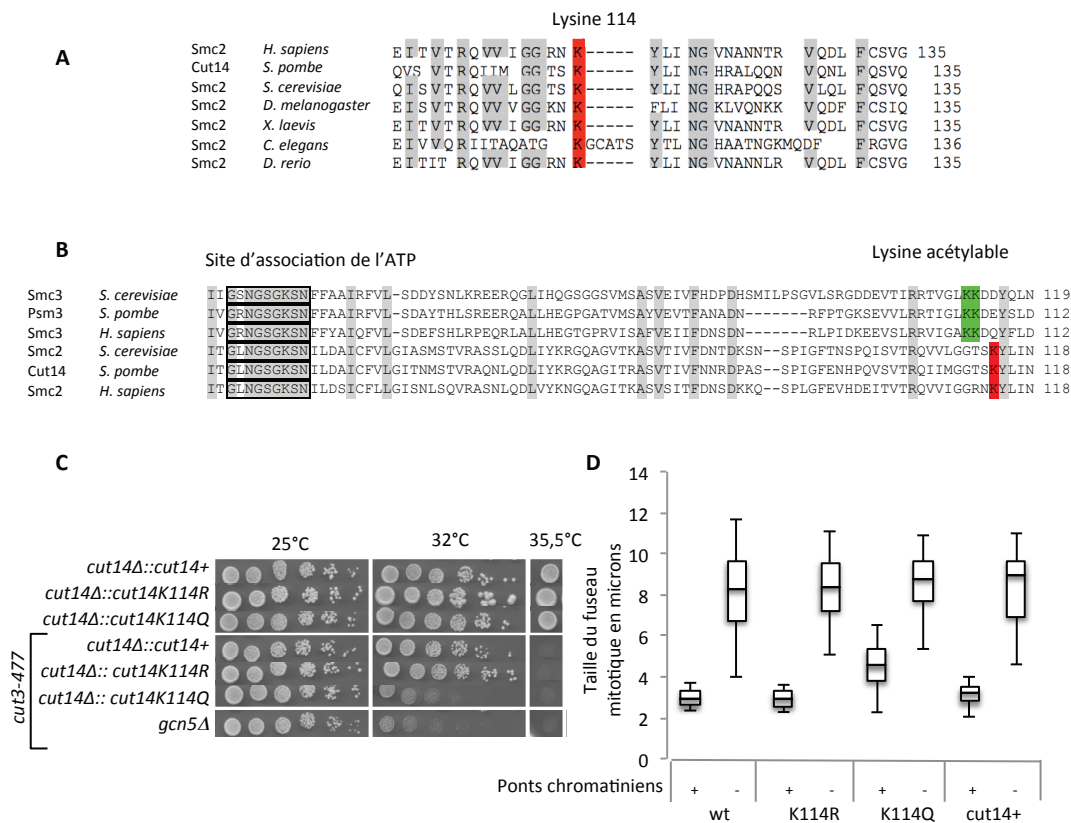


Figure 46. Analyses des mutants *cut14* non acétylable ou acétylée de manière constitutive.

A. Conservation du résidu K114 acétylable. **B.** Alignement des séquences de Smc3 de cohésine et Smc2 de condensine **C.** Interaction entre les mutations *cut14* avec *cut3-477*. **D.** Présence de ponts chromatiniens en fonction de la taille du fuseau n=100. Les cellules ont été ensuite traitées pour une immunofluorescence indirecte anti alpha-tubuline. La migration de la chromatine est suivie par une coloration au DAPI.

migration des chromosomes en anaphase, et, par conséquent, vraisemblablement aucun lien direct avec le rôle de Gcn5 dans la condensation mitotique.

3. Construction et analyses des mutants non acétylation ou mimant une acétylation constitutive de *cut14K114*

J'ai également construit les souches mutantes *cut14-K114R*, non-acétylable, et *cut14-K114Q*, mimant une acétylation constitutive.

Puisque le gène *cut14* est également un gène essentiel à la viabilité cellulaire, la stratégie à consister à créer une souche diploïde hétérozygote *cut14⁺/cut14Δ::NatR*, puis à insérer au locus *cut14Δ::NatR* le gène muté *cut14-K114R* ou *cut14-K114Q* (associé au marqueur d'auxotrophie *LEU2*), et, enfin, à isoler les descendants haploïdes *cut14Δ ::NatR_cut14-K114R-LEU2* ou *cut14Δ ::NatR_cut14-K114Q-LEU2*.

Si le rôle de Gcn5 était d'acétyler Cut14 en K114, alors la mutation *cut14-K114R* devait être colétale avec *cut3-477*, comme *gcn5Δ*. Au contraire, *cut14-K114Q* devait court-circuiter Gcn5 et supprimer la colétalité entre *gcn5Δ* et *cut3-477*. J'ai obtenu un résultat quasi-opposé (Figure 46C). La mutation *cut14-K114Q* est colétale avec *cut3-477*, et la version non-acétylable est sans effet. Par analyse cytologique, je n'ai observé aucun défaut de migration des chromosomes chez le mutant non-acétylable *cut14-K114R* comparé au contrôle sauvage (Figure 46D). En revanche, j'ai détecté des ponts chromatiniens persistant sur des fuseaux mitotiques dont la longueur était comprise entre 4 et 6 microns chez le mutant *cut14-K114Q*, suggérant un défaut modéré de condensation des chromosomes. L'ensemble de ces résultats suggère que la déacétylation de Cut14 est nécessaire au fonctionnement de condensine et réfute l'idée d'une acétylation de Cut14-K114 par Gcn5.

B. L'acétylation de H3K9 est nécessaire à la fixation de condensine

L'acétylation de H3K9 (H3K9ac) en amont des gènes est positivement corrélée à leurs niveaux d'expression (Wirén et al. 2005), suggérant un possible enrichissement de H3K9ac à proximité des sites occupés par Condensine. Gcn5 est nécessaire à l'acétylation des résidus K9, K18 et dans une moindre mesure K14 de l'histone H3, cette

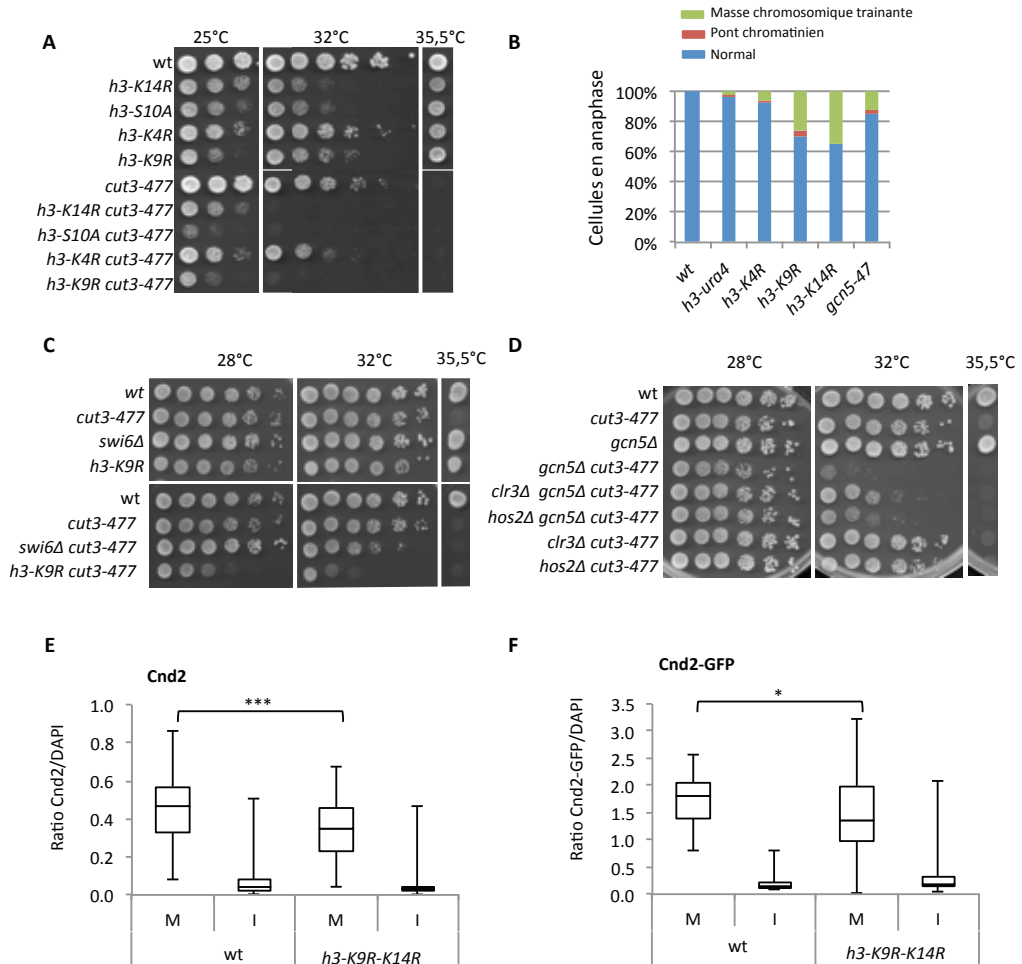


Figure 47. Lien entre l'acétylation des histones H3K9 et H3K14 et *cut3-477*.

A. Interaction entre les mutations non acétylables de H3 et *cut3-477*. **B.** Ségrégation des chromosomes en anaphase (fuseau mitotique > 6 μm) à partir de cellules cultivées 32°C en phase exponentielle de croissance et traitées pour une immunofluorescence indirecte de la tubuline et par coloration de l'ADN au DAPI. n=100. **C.** Interaction entre *swi6* et *cut3-477*. **D.** Effet de la délétion des HDAC Clr3 ou Hos2 sur la viabilité du mutant *gcn5Δ cut3-477*. **E.** Association de Cnd2 à la chromatine. **F.** Association de Cnd2-GFP à la chromatine (M pour mitose, I pour interphase). (E-F) Les cellules ont été cultivées en phase exponentielle de croissance à 32°C puis traitées pour un étalement de la chromatine. n=60. (***)p<0,001, (*p>0,05, test U)

modification étant principalement déposée par Mst2 (Nugent et al. 2010). L'acétylation est une modification réversible et le niveau à l'équilibre de H3K9ac chez *S. pombe* est déterminé (au moins en partie) par la compétition entre Gcn5 et les histone-déacétylases Clr3 et Hos2 (Johnsson et al. 2009).

1. Colétalité entre les histones non acétylables et *cut3-477*

1.1 H3K9R, K14R, S10A phénocopie Gcn5

Pour déterminer si l'acétylation de l'histone H3 par Gcn5 pourrait jouer un rôle dans l'association de condensine à la chromatine, nous avons tout d'abord examiné la conséquence d'un défaut d'acétylation de l'histone H3 sur la viabilité d'une souche *cut3-477*. On observe que les mutations non-acétylables *h3-K9R* ou *h3-K14R* sont colétales avec *cut3-477* à 32°C (Figure 47A). En revanche, la mutation *h3-K4R*, utilisée comme contrôle de spécificité, ne phénocopie pas la déficience de *gcn5*. Ces résultats suggèrent que l'acétylation de H3 au niveau des résidus K9 et K14 pourrait être impliquée dans le lien entre Gcn5 et la condensation. De plus, j'ai observé la présence de défauts de ségrégations des chromosomes par analyses cytologiques en réalisant une immunofluorescence contre l'alpha-tubuline dans les mutants d'histones non acétylables comme dans les mutants *gcn5-47* (Figure 47B).

Cependant, chez les mutants *h3-K9R*, non seulement l'acétylation de la lysine est impossible mais également la méthylation de ce résidu. Il est possible que l'interaction que l'on ait observée entre *cut3-477* et *h3-K9R* soit due à un défaut au niveau de l'hétérochromatine en interphase. J'ai alors testé l'interaction entre *cut3-477* et un mutant *Swi6Δ*. La protéine Swi6 est une protéine de l'hétérochromatine, homologue de HP1. L'absence de la protéine Swi6 ne rend pas le mutant *cut3-477* létal, ce qui suggère que la défaillance de méthylation n'est responsable de la colétalité entre *h3-K9R* et *cut3-477* (Figure 47C).

1.2 Restauration de la viabilité du mutant *gcn5Δ cut3-477* par la délétion de protéines HDAC

La mutation non-acétylable H3K9R est létale avec *cut3-477* à 32°C, comme l'est *gcn5Δ*. Réciproquement, la délétion de *clr3* restaure la croissance de la souche *gcn5Δ cut3-477* à 32°C (Figure 47D). La perte de fonction de Hos2 montre un moindre effet suppresseur. Ainsi, la survie du mutant *cut3-477*, défaillant pour la fixation de condensine à la chromatine, est particulièrement sensible au niveau d'acétylation de H3. Comme contrôle *sir2Δ* a été utilisé, et l'on n'observe pas de restauration de la croissance de la souche *gcn5Δ cut3-477* à 32°C (données non-montrées).

1.3 Association du Cnd2 dans les mutants d'histones *h3-K9R-K14R*

Enfin d'éprouver l'hypothèse d'un lien entre l'acétylation des histones et l'association de condensine à la chromatine, nous avons mesuré l'association de la sous unité Cnd2 de condensine à la chromatine chez le mutant d'histone H3 non-acétylable H3K9R-K14R par étalement de chromosomes. Je n'ai pas réussi à introduire les gènes *cut3-HA* et *dam1-gfp* dans un fond génétique *h3K9R-K14R*, peut être parce que la protéine Cut3-HA n'est pas pleinement fonctionnelle. Nous avons utilisée une souche *h3-K9R-K14R* en détectant les SPB fortement colorés par l'anticorps monoclonal MPM2 en mitose (MacIver et al. 2003) et Cnd2 a été détectée avec un anticorps polyclonal anti-Cnd2 (Aono et al. 2002). Nous avons observé une diminution modérée, mais statistiquement significative de l'association de Cnd2 à la chromatine en mitose chez le mutant *h3-K9R-K14R* (Figure 47E). Pour tenter d'éprouver ce résultat, Lia N'Guyen (stagiaire EPHE) a mesuré l'association de Cnd2-GFP à la chromatine par étalement de chromosomes, en utilisant l'anticorps monoclonal MPM2. Les résultats montrent une diminution de la quantité de protéine Cnd2-GFP associée aux chromosomes mitotiques (Figure 47F). Cependant cette diminution n'est pas statistiquement significative. Je ne peux donc conclure quant au rôle de l'acétylation de H3-K9 et -K14 vis-à-vis de l'association de condensine à la chromatine. Il est possible que l'acétylation de H3-K9 et/ou -K14 joue un rôle modeste et/ou restreint en cis, difficilement mesurable par une approche globale.

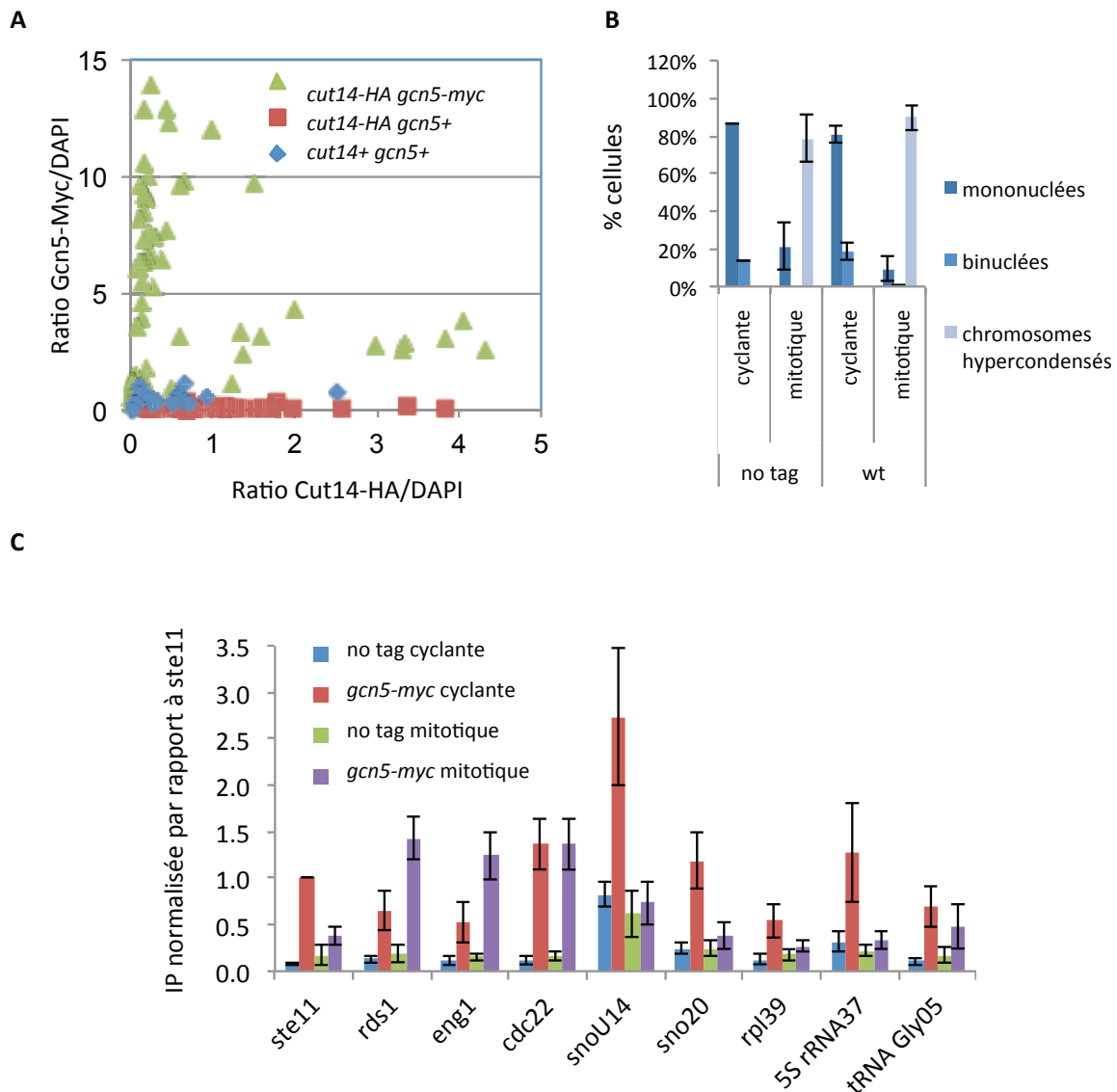


Figure 48. Gcn5 persiste sur la chromatine en mitose.

A. Association de Gcn5 à la chromatine par étalement de chromosomes n=30 X 2 expériences. **B-C.** Association de Gcn5 à la chromatine par ChIP contre Gcn5-Cmyc. **B-** Index mitotique calculés par coloration à l'HOECHST à partir de cellules *nda3-KM311* (no tag) et *nda3-KM311 gcn5-Cmyc* cultivées à 32°C en phase exponentielle de croissance (cyclantes et prométaphasiques) puis synchronisées en prométaphase par un arrêt *nda3-KM311* 7h à 17°C (cellules prométaphasiques). **C.** ChIP contre Gcn5-Cmyc sur les cellules synchronisées en pro-métaphase et cyclantes, les valeurs présentées correspondent aux moyennes et écart moyens normalisés par rapport à *ste11* et calculés à partir de 4 ChIP réalisés sur deux cultures indépendantes.

L'approche idéale serait de réaliser du ChIP, mais malheureusement je n'ai pas pu construire la souche *nda3-KM311 h3-K9R-K14R cnd2-GFP* nécessaire à la réalisation de l'expérience.

2. L'association chromosomique de Gcn5 est réduite mais persiste en mitose,

Si Gcn5 participe à la condensation mitotique des chromosomes, elle devrait être présente sur les chromosomes en mitose pour y faciliter la fixation de condensine. La détection de Gcn5, de son homologue P/CAF ou d'autres HATs par immunofluorescence sur des cellules murines ou humaines suggère que les HATs se dissocient en grande partie de la chromatine durant la mitose (Kruhlak et al. 2001; Orpinell et al. 2010). Nous avons testé l'association de Gcn5 à la chromatine durant la mitose chez *S. pombe* par étalement des chromosomes et par ChIP contre Gcn5-myc. Le signal Gcn5-myc détecté sur les chromosomes étalés décroît grand le signal Cut14 augmente (Figure 49A). Cut14 étant associée aux chromosomes principalement en mitose, cette observation suggère que Gcn5 est abondante sur les chromosomes en interphase et s'en dissocie en mitose. Notez que les signaux Gcn5-myc sont systématiquement supérieurs au bruit de fond mesuré sur les chromosomes *cut14-HA gcn5+* (Figure 48A), ce qui suggère qu'une fraction de Gcn5 reste associée aux chromosomes mitotiques. Alternativement, la moindre détection de Gcn5-myc sur les chromosomes mitotiques pourrait s'expliquer par un encombrement stérique de Cut14-HA.

L'expérience de ChIP a été réalisée par Esther Mollereau. Les cellules *gcn5-myc* ont été cultivées en phase exponentielle de croissance ou bloquées en mitose par la mutation *nda3-KM311*, et la chromatine a été immunoprécipitée avec un anticorps anti-myc. L'arrêt mitotique en prométaphase imposé par *nda3-KM311* a été validé par l'absence de cellules binucléées et l'accumulation de cellules montrant des chromosomes hypercondensés (Figure 48B). Le promoteur du gène *ste11*, occupé par Gcn5 en interphase (Helmlinger et al. 2008), a été utilisé comme contrôle positif pour une association de Gcn5-myc. Les résultats montrent que Gcn5-myc est présente en interphase au niveau des gènes fixés par condensine en mitose (Figure 48C). De plus Gcn5-myc persiste clairement en mitose aux sites de fixation de condensine *rds1*, *cdc22* et *eng1*. Le point commun de ces trois gènes est que leur transcription est régulée au cours du cycle (Gauthier et al. 2010). L'ensemble de ces résultats suggère que Gcn5

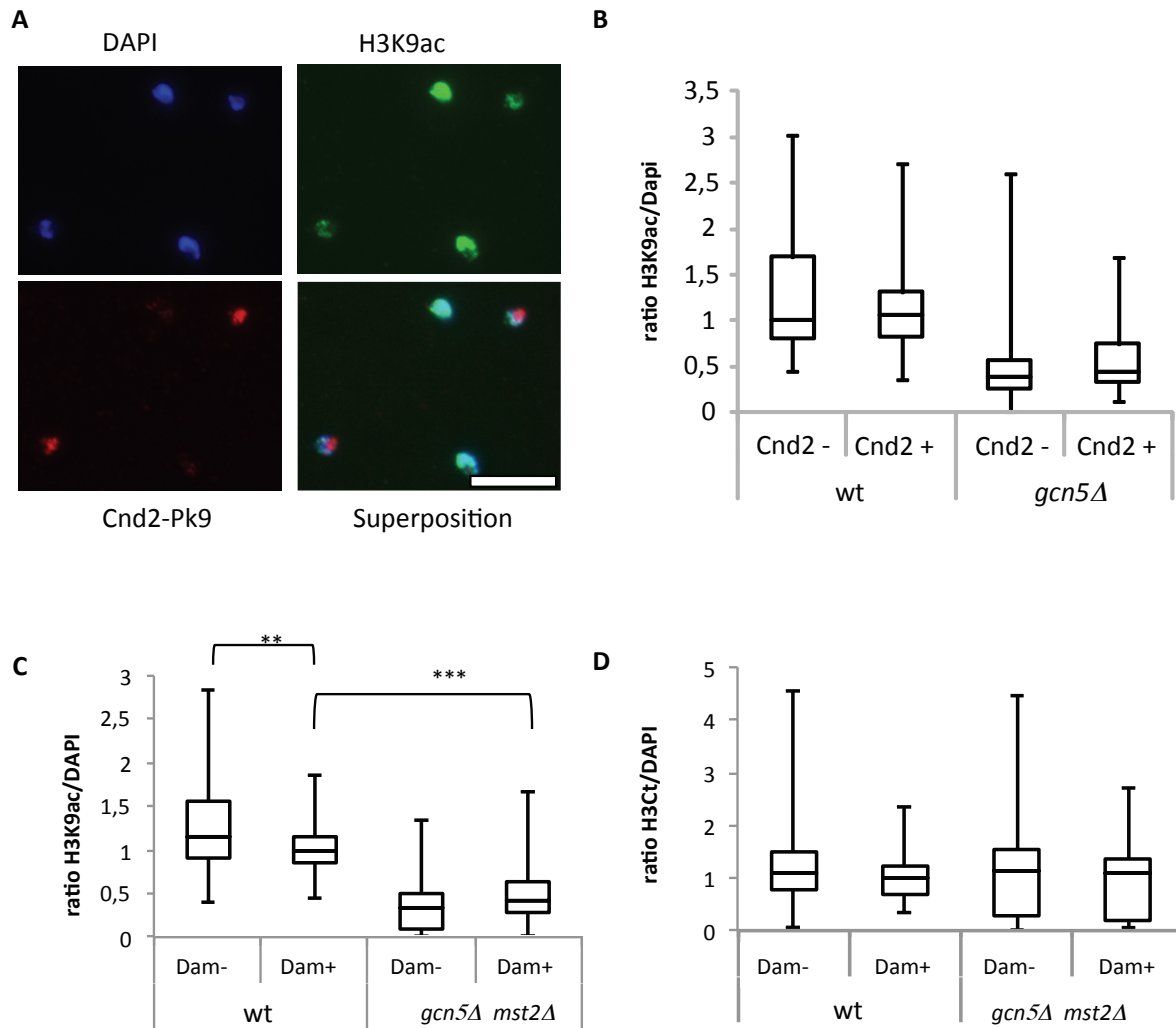


Figure 49. Présence H3K9ac dans les cellules mitotiques de *S. pombe*.

A. Étalement de chromosomes à partir de cellules sauvages cultivées en phase exponentielle de croissance à 32°C, la chromatine mitotique est suivie par la présence de signaux Cnd2-Pk9 chromosomique. Barre : 5 microns. **B.** Quantification des signaux H3K9ac/DAPI en fonction des signaux Cnd2- (Interphase), Cnd2+ (Mitose). **C.** L'association de H3K9ac à la chromatine mitotique (dam+) ou interphasique (dam-) a été mesurée par étalement de chromosomes dans le mutant *gcn5Δmst2Δ*. (** $p < 0,05$, *** $p < 0,001$, test U) $n=30$. Les valeurs sont issues de 3 expériences indépendantes, chacune est normalisée par rapport à la valeur de médiane de la population des chromosomes issus de cellules sauvages en mitose (dam+) qui est propre à chacune des expériences. **D.** En parallèle, l'association de H3 (H3C γ) à la chromatine mitotique (dam+) ou interphasique (dam-) a été mesurée par étalement de chromosomes dans le mutant *gcn5Δmst2Δ*.

persiste sur les chromosomes en mitose, en certains sites occupés par condensine, et que ces sites pourraient être enrichis en gènes périodiques.

2.1 Association de H3K9ac, H3K14ac et H3K18ac à la chromatine en mitose

Bien que la majorité des HATs se dissocie de la chromatine en mitose suivi d'une déacétylation du gros de la chromatine (Kruhlak et al. 2001; Orpinell et al. 2010), des traces d'acétylation persistent sur les chromosomes mitotiques, notamment au niveau des bandes R, riches en gènes (Kouskouti et Talianidis 2005; Terrenoire et al. 2010). Afin d'adresser rapidement la présence ou non d'histone H3 acétylée dans les chromosomes mitotiques chez *S. pombe*, j'ai recherché H3K9ac par immunofluorescence sur des étalement des chromosomes, en identifiant les chromosomiques mitotiques par la présence de Cnd2-Pk9 (Figure 49A). J'ai observé un signal H3K9ac fort sur les chromosomes interphasiques, et plus sensiblement plus faible sur les chromosomes mitotiques (Figure 49B). De façon cruciale, ce signal H3K9ac mitotique était dépendant de Gcn5 (Figure 49B). Comme il était cependant formellement possible que la diminution du signal H3K9ac mesurée sur les chromosomes mitotiques résulte d'un encombrement stérique avec les anticorps anti-Pk9 plutôt qu'à une réelle déacétylation, j'ai reproduit l'expérience, cette fois en utilisant la protéine centromérique Dam1-GFP comme marqueur mitotique (Figure 49C). J'ai également immunodétectée l'histone H3 totale (avec un anticorps dirigé contre la partie C-terminale de H3) pour prendre en compte l'occupation des chromosomes mitotiques par H3. Les résultats montrent que la quantité de H3K9ac diminue en mitose, mais une fraction persiste et cette fraction est dépendante de Gcn5 et Mst2 (Figure 49C). Au contraire, l'association de H3Ct chromosomique reste constante en mitose (Figure 49D) et ne semble pas altérée chez le mutant *gcn5Δ mst2Δ*. Ces observations indiquent que la chromatine est en partie déacétylée en mitose chez *S. pombe* mais des traces persistent, et cette acétylation mitotique résiduelle est dépendante de Gcn5 et Mst2.

La présence de H3K9ac, en mitose, aux sites chromosomiques occupés par condensine, a été recherchée par ChIP. Des cellules *nda3-KM311 cnd2-gfp* ont été bloquées en prométaphase à 17°C, et traitées pour un ChIP anti H3K9ac et anti-H3C-terminale. Les

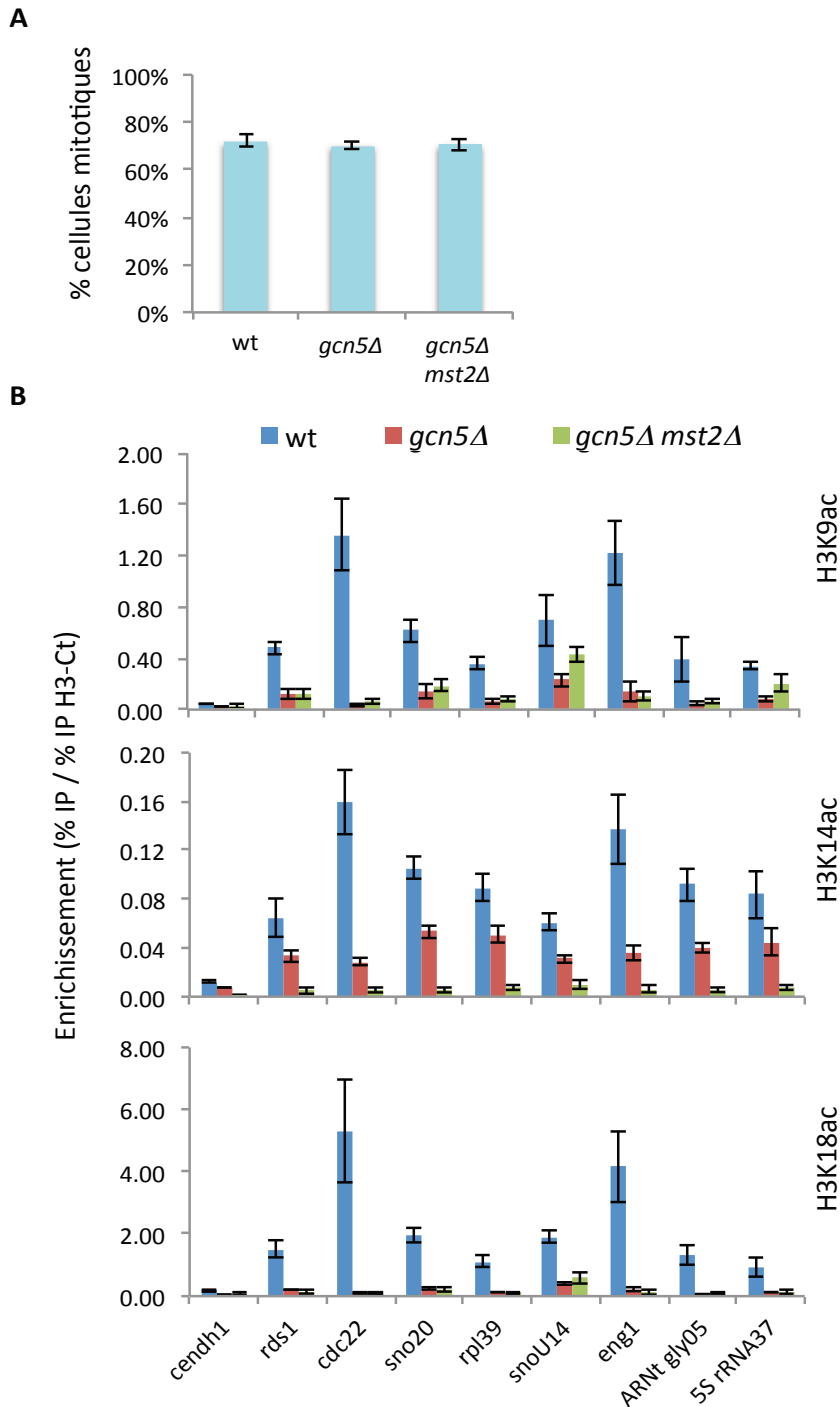


Figure 50. L'acétylation de H3K9, K14 et K18 dépendante de Gcn5 persiste au niveau des sites d'association de condensine à la chromatine.

Les cellules ont été bloquées en prométaphase à 17°C et traitées pour une quadruple immunoprécipitation de la chromatine avec des anticorps anti H3-Cterm, H3K9ac, H3K14ac et H3K18ac. **A.** Les indexes mitotiques ont été déterminés en mesurant le % de cellules accumulant Cnd2-GFP dans le noyau. **B.** ChIP H3K9ac. (panneau du haut), ChIP H3K14ac (panneau du milieu). ChIP H3K18ac (panneau du bas). Les valeurs indiquées correspondent aux moyennes et écarts moyens calculés à partir de trois expériences indépendantes.

arrêts mitotiques ont été validés en mesurant les pourcentages de cellules accumulant Cnd2-GFP dans le noyau (Figure 50A). Les pourcentages d'IP mesurés pour H3-C-terminale permettent de prendre en compte l'occupation des sites chromosomiques par les nucléosomes. Ainsi, le niveau d'acétylation d'H3K9 en un site donné est déterminé comme le ratio du pourcentage IP H3K9ac sur le pourcentage IP H3 (H3Ct). Le site *cendh1* qui correspond à l'hétérochromatine centromérique, méthylée en position H3K9, sert de contrôle négatif. Les résultats montrent que la marque H3K9ac est présente sur l'ensemble des sites d'association de condensine de façon Gcn5-dépendante dépendante (Figure 50). Mst2 contribue peu ou pas à l'acétylation de H3K9 en ces sites.

L'analyse étendue aux résidus H3K14 et H3K18 montre une persistance de leur acétylation en mitose aux mêmes sites chromosomiques ceux occupés par H3K9ac et condensine. Gcn5 et Mst2 contribuent à l'acétylation de H3K14, tandis que H3K18ac est principalement déposée par Gcn5. L'ensemble de ces travaux montre que les marques d'acétylations H3K9ac, H3K14ac et H3K18ac, déposées par Gcn5 et/ou Mst2, persistent sur les chromosomes aux sites occupés par condensine. Ces données sont cohérentes avec un rôle de ces marques chromatiniennes dans l'association de condensine à la chromatine.

Ces expériences ont été réalisées en collaboration avec Esther Mollereau.

C. Conclusion II :

L'objectif de cette partie de mon travail de thèse était de comprendre comment Gcn5 prend part à l'association de condensine à la chromatine. Mes résultats suggèrent que Gcn5 pourrait faciliter la fixation de condensine en acétylant l'histone H3 au niveau des gènes occupés par condensine en mitose. L'acétylation des nucléosomes par Gcn5 pourrait être un des aspects qui lie la localisation chromosomique de condensine à la transcription depuis les levures jusque chez l'homme.

Chapitre V : Discussion Générale

Partie I : Le crible

Afin d'identifier de nouveaux facteurs de condensation mitotique des chromosomes collaborant avec le complexe condensine chez *S. pombe*, nous avons réalisé un crible génétique de létalité synthétique avec condensine (*cut3-477*). Ce crible nous a permis d'identifier de nouvelles mutations dans les sous unités de condensine Cut14, Cnd1 et Cnd3 et également dans la protéine kinase Aurora B, qui régule l'association de condensine à la chromatine durant la mitose (Tada et al. 2011). Ces premiers résultats nous montrent l'efficacité du crible pour identifier des facteurs de condensation. Sur 180 000 clones criblés, en plus des mutants pour les gènes condensation connus, 6 mutants *slc* et un suppresseur ont été isolés. Cependant, 8 groupes de liaisons sont représentés par une seule et unique mutation *slc*, ce qui montre que le crible n'est pas saturé et suggère l'existence d'autres gènes *slc* dans le génome. Pourtant, avec un taux de mutations induites par l'EMS estimé à 10^{-4} /gène, 180 000 colonies représentent une couverture théorique de plus de 18 fois le génome de *S. pombe*. La non-saturation suggère l'existence de nombreux gènes interagissant avec *cut3*. Cette dernière pourrait tenir aux multiples fonctions de condensine (interphase et mitotique). En accord avec cette idée, à partir de la cartographie des interactions génétiques réalisée par Ryan et al., Cut3 interagirait avec au moins 32 gènes non essentiels (Ryan et al. 2012), incluant *gcn5* et *ulp2* mais étonnamment pas *snf21*, *arp9*, *cph2* et *mga2*.

Les mutations *slc* isolées sont toutes récessives. Il s'agirait donc de mutations engendrant une perte de fonction, suggérant que les facteurs Slc affecté interagissent positivement avec Cut3. De plus, les analyses cytologiques des cellules mutantes *slc* montrent des défauts de migration des chromosomes en anaphase, cohérents avec une altération de la condensation mitotique. Quant à la mutation *sup122*, elle est également récessive mais elle restaure la croissance de la souche mutante *cut3-477* à 34°C et réduit quasiment de moitié la fréquence de ponts chromatiniens en anaphase, ce qui suggère que *nut2-122* (*sup122*) restaure la croissance de la souche *cut3-477* en compensant partiellement son défaut de condensation (Figure 35). La protéine Nut2 régulerait ainsi de façon négative la condensation mitotique des chromosomes. L'identification des mutations isolées ont permis de révéler des mutations affectant les

gènes *gcn5*, *arp9*, *snf21*, *cph2*, *mga2*, *ulp2* et *nut2*, 7 gènes jusqu'alors jamais décrits pour leur implication dans la condensation mitotique des chromosomes chez *S. pombe* (Tableau 5).

Identification de nouveaux allèles de gènes de condensation

Parmi les 190 candidats potentiellement *slc* de départ, nous avons près de la moitié de ces candidats possédant une mutation secondaire dans *cut3-477*. A ce jour, seules la mutation *cut3-477* (Saka et al. 1994) et plus récemment les mutations *cut3-m26* et *cut3-I23* (Petrova et al. 2013) ont été identifiées. Ces 3 mutations se situent au niveau de la région C-terminale de Cut3 au niveau du domaine *coiled coil* pour *cut3-477* et *cut3-I23* et au niveau du domaine ATPase pour *cut3-m26*. Ainsi parmi les mutants affectés par une seconde mutation dans *cut3-477* on peut espérer identifier des nouveaux allèles de *cut3*. Et la caractérisation de ces mutants pourrait nous apporter des informations plus fines quant aux différentes fonctions de condensine au travers du cycle cellulaire.

Les tests de complémentation ont montré que les mutations *slc71*, *slc85*, *slc90/slc173/slc179* et *slc180* affectent le gène *cut14*; les mutations *slc175*, *slc181* et *slc182* affectent le gène *cnd1*; la mutation *slc184* le gène *cnd3* et la mutation *slc190* le gène *ark1* (Tableau 5). L'identification de chacune de ces mutations a permis de révéler qu'il s'agit uniquement de nouveaux allèles de condensine et d'Aurora B. Parmi ces mutations, seule *cut14-71* (*slc71*) confère une hypersensibilité au TBZ (Figure 25). Il a récemment été mis en évidence que le complexe Pcs1/Mde4 recrute condensine au niveau des kinétochores (Tada et al. 2011). La mutation *pcs1Δ* est comme *cut14-71* colétale avec *cut3-477* et confère une thermosensibilité au TBZ. Ainsi, le mutant *cut14-71* pourrait affecter l'association ou l'activité de condensine en partie au niveau centromère. Cependant, Cut14 ne semble pas interagir directement avec Pcs1 (Tada et al. 2011) et la protéine Cut14-71 possède une mutation correspondant à un remplacement d'une glycine en aspartate en position 397 (G397D), placé au tout début du domaine *coiled coil* non conservé au cours de l'évolution. Pourquoi la mutation *cut14-71* aurait un impact spécifique de condensine sur le fonctionnement des kinétochores reste énigmatique. Quant aux 3 autres allèles de *cut14*, les mutations *slc85*, *slc90/slc173/slc179* et *slc180* affectent des résidus conservés localisés au niveau de la région charnière (*hinge*). Notamment, la mutation *slc90/slc173/slc179* affecte un résidu thréonine conservé de la

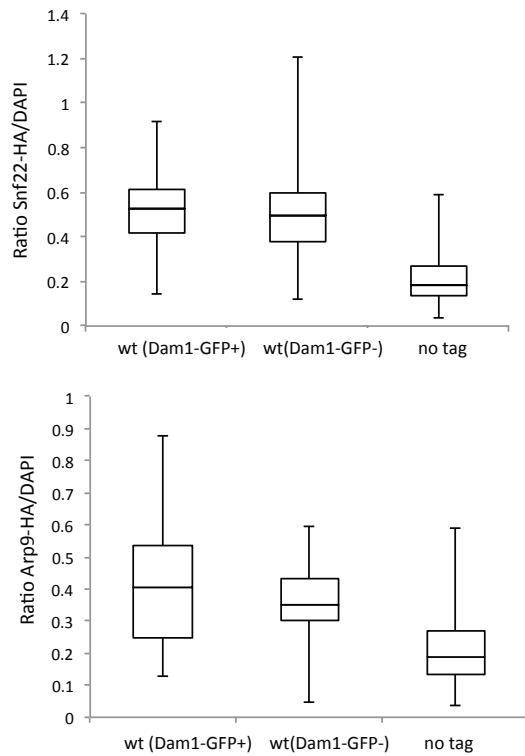


Figure 51 Association de Snf22 et Arp9 à la chromatine

en interphase et en mitose. (données préliminaires)

L'association de Snf22-HA (panneau du haut) ou Arp9-HA (panneau du bas) à la chromatine mitotique (dam+) ou interphasique (dam-) a été mesurée par étalement de chromosomes dans les cellules sauvages. n=30.

bactérie à l'homme. Ce résidu se trouve proche des séquences formant l'interface de dimérisation essentielles pour la formation de l'hétérodimère SMC2/Cut14-SMC4/Cut3 et l'association de condensine à la chromatine (M. Hirano et Hirano 2002). Ces mutations pourraient altérer cette dimérisation.

De plus, parmi les 3 nouveaux allèles de *cnd1*, seule *cnd1-175* est hypersensible à des doses sublétales de HU mais pas aux irradiations par UV-C (cf supp data (Robellet et al. 2014)), ce qui suggère que Cnd1 pourrait être impliquée dans le mécanisme de réparation des dommages à l'ADN causés par une altération de la dynamique de la réplication. L'étude de ce mutant pourrait donner des informations nouvelles sur les fonctions de condensine dans la réparation des dommages à l'ADN. D'une manière générale, l'analyse plus approfondie de cette collection de mutants de condensine pourrait être précieuse pour la caractérisation plus fine de condensine.

Lien entre la condensation et le remodelage de la chromatine

La protéine Arp9 est une sous unité des complexes de remodelage de la chromatine : Swi/Snf et RSC et la protéine Snf21 est l'ADN hélicase ATP-dépendante du complexe RSC (Monahan et al. 2008). Les mutants *arp9-127* et *snf21-129* présentent les mêmes phénotypes : ils sont tous deux thermosensibles à 35,5°C, hypersensibles à des doses sublétales de HU, hypersensibles au TBZ (Figure 25) et présentent une haute fréquence de défauts de migration des chromosomes en anaphase à 32°C et 35,5°C (Figure 30 ; papier X.Robellet et al 2014). En accord avec mes résultats, la délétion de la protéine Arp42 (sous unité des complexes RSC-Swi/Snf) ou Snf5 (sous unité du complexe Swi/Snf), est colétale avec *cut3-477* (Ryan et al. 2012). Mes résultats préliminaires sur l'association de Snf22-HA et Arp9-HA sur la chromatine obtenus par étalement de la chromatine montrent que Arp9 est légèrement plus enrichi sur la chromatine en mitose qu'en interphase, alors que le niveau de Snf22 chromosomique semble constant tout au long du cycle (Figure 51). L'ensemble de ces données suggère que l'interaction colétale entre *cut3-477* et *arp9-127* pourrait être dû à l'addition d'un défaut de condensation et d'une altération du complexe RSC. Le complexe RSC, aurait un rôle plus direct dans la condensation mitotique que le complexe Swi/Snf. De plus, il a été montré que le complexe RSC est impliqué dans les fonctions du kinétochore chez *S. cerevisiae* (Hsu et al. 2003), ce qui pourrait expliquer le phénotype d'hypersensibilité au TBZ du mutant

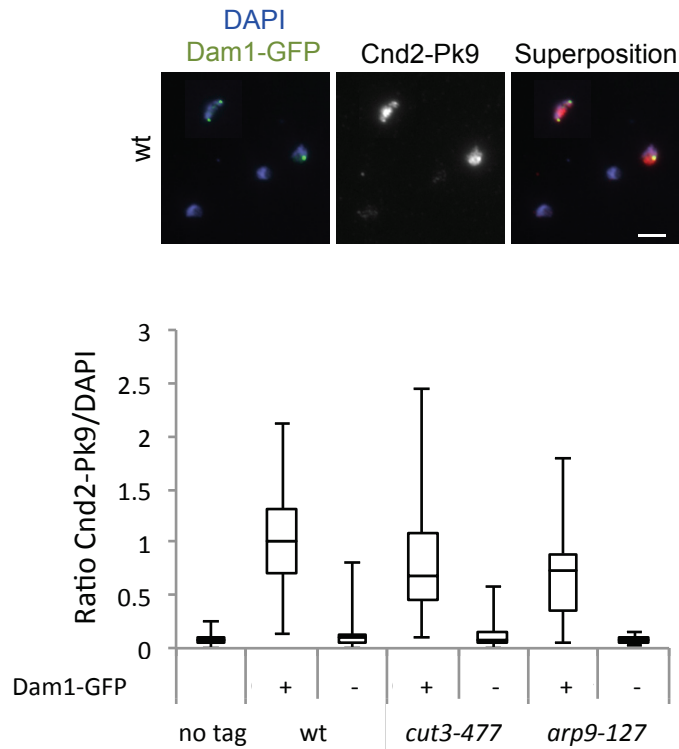


Figure 52 Association de condensine (Cnd2-Pk9) à la chromatine dans le mutant *arp9-127*

Les chromosomes sont étalés sur des lames de verre à partir des cellules en phase exponentielle de croissance à 32°C, la chromatine mitotique est suivie par la présence de signaux Dam1-GFP chromosomique Barre : 5 microns (Panneau du haut) et l'intensité des signaux Cnd2-Pk9 interphasique (dam-) ou mitotique (dam+) sont quantifiés par rapport à l'intensité du DAPI (panneau du bas) n=30. Les valeurs sont issues de 3 expériences indépendantes, chacune est normalisée par rapport à la valeur de médiane de la population des chromosomes issus de cellules sauvages en mitose (dam+) qui est propre à chacune des expériences.

arp9-127. L'ensemble des data suggère un rôle des facteurs de remodelage dans la condensation mitotique. Cependant, les facteurs de remodelages de la chromatine agissent sur la régulation de transcription. Nous ne pouvons pas exclure que l'effet de ces facteurs, Arp9 et Snf21, sur la condensation mitotique soit indirect, bien que les niveaux d'expression des gènes de condensine et de la topoisomérase II ne soient pas diminués chez les mutants *arp9-127* et *snf21-129*. L'hypersensibilité aux doses sublétales de HU des mutants *arp9-127* et *snf21-129* suggèrent une altération de réplication de l'ADN en phase S (Figure 25). Les défauts de migrations observés chez ces mutants pourraient être le résultat de chromosomes partiellement répliqués.

Des études, réalisées à partir d'extraits d'œufs de Xénope, ont montré que le complexe de remodelage ISWI est prédominant sur les chromosomes mitotiques, ce qui suggère que ce complexe a un rôle en mitose (MacCallum et al. 2002). Le remodelage de la chromatine induit par le complexe ISWI en mitose pourrait avoir un rôle dans l'association des complexes cohésine et/ou condensine sur la chromatine. De plus, le complexe RSC facilite l'association de cohésine le long des bras des chromosomes (Huang, Hsu, et Laurent 2004). Et les résultats des étalements de chromosomes ont montré une diminution de l'association de Cnd2-pk9 à la chromatine en mitose dans le mutant *arp9-127* (Figure 52). Ainsi, comme ce complexe ISWI, le complexe RSC pourrait avoir un rôle dans la condensation mitotique en étant impliqué dans le recrutement de condensine sur la chromatine lors de la mitose.

D'une manière générale, les facteurs de remodelage de la chromatine ATP-dépendant pourraient être impliqués activement dans l'association de condensine à la chromatine au niveau des promoteurs des gènes transcrits (cf discussion Partie II), ce qui pourrait apporter de nouvelles informations sur le lien entre la transcription et la condensation.

Des études complémentaires seront nécessaires pour déterminer si le lien entre ces facteurs de remodelage de la chromatine et la condensation est directe ou non.

Lien entre la condensation mitotique et la transcription

De plus, parmi les mutants *slc* isolés par Xavier Robellet et moi, la majorité de ces mutants montre que la protéine Cut3-477 confère une hypersensibilité à des défaillances de facteurs transcriptionnels (cf papier (Robellet et al. 2014)). En effet, la délétion de protéines impliquées dans la régulation de la transcription telles que Cph2, Mga2 ou Gcn5 est colétale avec *cut3-477*, et les caractérisations initiales des mutants

cph2-174, *mga2-178* et *gcn5-47* suggèrent que ces facteurs aient un rôle dans la condensation mitotique.

Par exemple, la protéine Cph2 est associée à l'histone dé-acétylase Clr6 au sein du complexe Clr6 type II (Nicolas et al. 2007). Ce complexe dé-acétyle les histones au niveau des régions codantes des gènes, supprimant ainsi la transcription des gènes du brin antisens (Nicolas et al. 2007). Chez *S. cerevisiae*, il a été montré que la protéine Rpd3, l'homologue de Clr6, est responsable de la dé-acétylation des histones H4K5 et H4K12 impliquée dans le recrutement de condensine au niveau des régions d'ADNr en réponse à une réduction de nutrition (Tsang, Li, et Zheng 2007). Ainsi Cph2 pourrait être impliquée dans la régulation de Clr6 dans son rôle pour la condensation mitotique modulée par le niveau d'acétylation des nucléosomes et/ou la dé-acétylation de condensine elle-même.

De plus, nous avons obtenu à l'issue du crible un supprimeur de *cut3-477* à 34°C, identifié comme Nut2 (. Nut2 est une sous unité du complexe médiateur (Spåhr et al. 2000), qui interagit physiquement avec les facteurs de transcriptions et l'ARN polymérase II (Conaway et Conaway 2011). Nut2 semble avoir un rôle négatif dans la condensation mitotique des chromosomes. Sa délétion permettrait une activité de condensation supplémentaire. Nut2 pourrait être impliqué dans l'expression des régulateurs négatifs de la condensation mitotique des chromosomes. Une autre hypothèse basée sur le fait que la transcription et la condensation sont deux mécanismes antagonistes, serait qu'une réduction de la transcription causée par la délétion de Nut2 facilite l'association de condensine à la chromatine. Il a été montré chez les cellules humaines que le complexe médiateur interagit avec cohésine et co-réside au niveau des gènes actifs (Kagey et al. 2010). La délétion de Nut2 pourrait compenser la déficience de condensation par une augmentation de cohésine à la chromatine. Comme condensine II et cohésine ont certains sites d'association à la chromatine commun (Downen et al. 2013), il est également envisageable que le complexe médiateur soit impliqué dans le recrutement de condensine à la chromatine en certains sites chromosomique et que Nut2 régulerait négativement cette activité.

La délétion du gène *pht1Δ* supprime également le phénotype thermosensible de la souche *cut3-477* à 34°C (H.-S. Kim et al. 2009), et les mutations *nut2-122* et *pht1Δ* sont synthétiquement colétales. Ces résultats montrent un lien fonctionnel entre ces deux

gènes. Le gène *pht1* code le variant d'histone H2A.Z. La sous unité Cnd2 de condensine interagit physiquement avec les histones H2A et H2A.Z (Tada et al. 2011) et la perte de fonction de H2A.Z engendre des défauts de condensation en anaphase (H.-S. Kim et al. 2009; Tada et al. 2011). La suppression du phénotype thermosensible de *cut3-477* s'expliquerait par la présence d'un autre facteur de condensation, le RCA (Vagnarelli et al. 2006). Ainsi, Pht1 serait impliquée dans deux fonctions. D'une part, elle serait impliquée dans l'inactivation du RCA en début d'anaphase pour laisser la place à condensine sur les chromosomes et d'autre part, elle stabiliserait le complexe condensine à la chromatine (H.-S. Kim et al. 2009). Les analyses cytologiques des mutants *nut2* montrent que ces mutants ont un phénotype similaire à celui du mutant *pht1Δ*. Ainsi, comme Pht1, Nut2 pourrait être impliqué dans la régulation des facteurs de condensation tels que RCA. De plus, Nut2 interagit génétiquement avec Dis2 (Buttrick et al. 2011). Or Pht1 et Dis2 seraient impliquées dans la même voie pour réguler la condensation mitotique (H.-S. Kim et al. 2009). Nut2 pourrait ainsi être impliquée dans cette même voie.

Concernant la protéine Gcn5, elle est une sous unité du complexe SAGA (Spt-Ada-Gcn5 acétyltransférase). Ce complexe est un co-régulateur de la transcription (Nagy et Tora 2007). Gcn5 possède un domaine activité acétyltransférase et un bromodomaine. Cette protéine est connue pour acétyler les histones H3K9, H3K14 et H3K18 au niveau des promoteurs des gènes fortement transcrits (Grant, Berger, et Workman 1999). Cette protéine pourrait être impliquée dans la condensation mitotique via l'acétylation des histones ou l'acétylation de condensine directement (cf discussion partie II).

D'une manière générale, les cartographies des condensines I et II réalisées chez les différentes espèces montrent que ces dernières sont enrichies au niveau des promoteurs de gènes actifs. De même chez les procaryotes, le complexe condensin-like s'associe au niveau des gènes fortement transcrit. Or parmi les 7 gènes obtenus à l'issu du crible impliqués dans la condensation, 6 d'entre eux sont impliqués dans la transcription : *arp9*, *snf21*, *cph2*, *mga2*, *gcn5* et *nut2*. Et, la base de donnée PomBase référence 39 interactions génétiques avec *cut3* et parmi lesquelles on trouve 11 gènes liés à la transcription (V. Wood et al. 2012). Les facteurs de remodelages ont une action sur le positionnement des nucléosomes au niveau des promoteurs des gènes, dans le but de

rendre l'ADN accessible à la machinerie transcriptionnelle. Et les facteurs Cph2, Mga2 et Nut2 sont impliqués dans la transcription via la régulation de l'ARN polymérase II. Ces data suggèrent un lien entre la condensation mitotique et la machinerie transcriptionnelle.

Cependant nous ne pouvons pas exclure un possible rôle pour ces facteurs Slc dans la régulation de la voie de topoisomérase II et/ou de RCA.

PARTIE II : Gcn5 et la condensation mitotique

Les données sur l'association du complexe condensine à la chromatine montrent que condensine à une affinité pour les gènes fortement transcrits suggérant un lien entre la condensation mitotique des chromosomes et la transcription. Ces deux mécanismes apparaissent pourtant comme antagonistes. Mais le fait que cette affinité entre condensine et les gènes fortement transcrits est conservée de la levure à l'homme et est également présente entre les complexes SMC bactériens (condensin-like) et les gènes actifs, nous montre que ce lien est conservé. Or nous avons identifié Gcn5, une protéine ayant un rôle fondamental dans l'activation de la transcription au sein du complexe SAGA (Nagy et Tora 2007), comme un collaborateur de condensine. L'étude du rôle de Gcn5 dans la condensation mitotique des chromosomes était intéressante pour une compréhension plus approfondie du lien entre la transcription et la condensation.

Rôle de Gcn5 dans la condensation mitotique

Les expériences de ChIP Cnd2-GFP et d'étalement de chromosomes Cut3-HA Dam1-GFP chez les cellules mutantes *gcn5* nous suggèrent que la déficience ou l'absence de Gcn5 entraîne une diminution de l'association du complexe condensine à la chromatine (Figure 43, 44). De part le rôle de Gcn5 dans la transcription, nous nous sommes assurés que l'expression des gènes de condensation n'était pas diminuée dans les mutants *gcn5* (Figure 40). De plus, l'interaction entre *gcn5* et *cut3* est spécifique et l'absence de Gcn5 ne semble pas avoir d'impact sur l'intégrité du complexe condensine (Figure 40). Les analyses cytologiques et l'essai de condensation (collaboration C. Hearing) montrent que Gcn5 est nécessaire à la condensation des bras de chromosomes (Figure 40).. Le mutant *gcn5-47* présente en effet des ponts chromatiniens (chromosomes connectés trainants) sur des fuseaux plutôt courts, inférieur à 7 microns, comparé à ceux des mutants *cut3-477*, où l'on observe ce défaut

jusqu'à 12 microns. Passé 7 microns, les ponts chromatiniens disparaissent. Ces résultats suggèrent que la présence de ces chromosomes trainants chez le mutant *gcn5-57* serait due d'un défaut en tout début d'anaphase et ce défaut serait compensé par l'élongation du fuseau (Figure 40). Une altération dans la suppression des caténats entre les chromatides sœurs, causée par une réduction de la topo II chromatinienne lorsque Gcn5 est déficiente, pourrait expliquer ce phénotype. Cependant, les résultats des analyses d'étalement de la chromatine ne montrent pas de diminution significative de l'association de la topo II à la chromatine chez un mutant *gcn5Δmst2Δ* en mitose. Mais, une interaction génétique entre la mutation *gcn5Δ* et la mutation *top2-250* est présente. Ceci suggère que Gcn5 pourrait être impliqué dans la régulation de l'activité de la topo II en mitose.

Alternativement, chez *S. cerevisiae*, le complexe condensine est impliqué dans le super-enroulement de la chromatine durant l'anaphase (Renshaw et al. 2010). La réduction de l'association de condensine à la chromatine en l'absence de Gcn5 pourrait altérer cette activité au niveau des bras des chromosomes et la migration des centromères en début d'anaphase pourrait engendrer le phénotype des bras de chromosomes trainants le long du fuseau et expliquer la non présence de ponts chromatiniens en fin d'anaphase.

Gcn5 et l'acétylation du complexe condensine

Gcn5 est capable d'acétyler des protéines non histones (Cai et al. 2011; J.-H. Kim et al. 2010; Paolinelli et al. 2009). Le complexe condensine est acétylé sur les sous-unités SMC2 et SMC4 chez l'Homme (Bazile, St-Pierre, et D'Amours 2010; Choudhary et al. 2009) et Cut3 chez *S. pombe* (Javerzat, communication personnelle). Nous avons donc posé la question de l'acétylation Gcn5-dépendante du complexe condensine. Les résultats de Co-IP entre Cut3 et Gcn5 suggèrent que le complexe condensine n'interagit pas avec Gcn5 ou que cette interaction est transitoire. Cependant, les sites acétylables testés sur Cut3 et Cut14 ne semblent pas jouer un rôle majeur dans la condensation mitotique des chromosomes et de fait ne semblent pas être impliqués dans le rôle de Gcn5 dans la condensation mitotique des chromosomes. Mais, mes résultats n'excluent en aucun cas le fait que d'autres lysines soient acétylées par Gcn5 et que cette/ces acétylation(s) soi(en)t régulatrice(s) de l'association de condensine à la chromatine, comme c'est le cas pour le complexe cohésine dont l'association à la chromatine est stabilisée par l'acétylation de Smc3 (Nasmyth 2011). Cette piste n'est pas exclusive d'un rôle pour

Gcn5 également au travers de l'acétylation des histones. Gcn5 pourrait agir sur le recrutement de condensine via l'acétylation des histones et réguler cette association en acétylant le complexe condensine. En accord avec cette hypothèse, la protéine Gcn5 est majoritairement dissociée de la chromatine en mitose, mais on retrouve Gcn5 persistant sur la chromatine sur certains sites, tels que *rds1*, *cdc22* et *eng1*.

L'acétylation de H3K9 et l'association de condensine à la chromatine

Gcn5 est une acétyltransférase conservée, co-activatrice de la transcription (Koutelou, Hirsch, et Dent 2010) qui occupe les promoteurs des gènes, proportionnellement à leurs niveaux d'expression (Johnsson et al. 2009; Robert et al. 2004), et qui acétyle l'histone H3, notamment au niveau des lysine 9, 14 et 18. Nous avons donc adressé la question d'une implication de l'acétylation de H3 Gcn5-dépendante dans la condensation mitotique. Les mutations non acétylables H3K9R et H3K14R sont, comme *gcn5Δ*, colétales avec *cut3-477* et la colétalité entre *gcn5Δ* et *cut3-477* peut être supprimé en éliminant l'HDAC Clr3, ce qui restaure un peu l'acétylation de H3K14 et H3K9 dans les régions intergéniques (Johnsson et al. 2009; Wirén et al. 2005) (Figure 47). L'ensemble de ces données suggère que la baisse du niveau d'acétylation de l'histone H3 en l'absence de Gcn5 est responsable de la diminution de l'association de condensine à la chromatine.

Bien que le gros de la chromatine soit déacétylé et que Gcn5 semble absente des chromosomes en mitose chez les vertébrés (Kruhlak et al. 2001; Orpinell et al. 2010), des traces de H3K9ac ont été détectées au niveau de certains promoteurs (Kouskouti et Talianidis 2005; Valls, Sánchez-Molina, et Martínez-Balbás 2005). Nos résultats montrent la présence de traces de H3K9ac en mitose chez *S. pombe*, dépendantes de la présence de Gcn5. Ces traces semblent persister au niveau des sites régulés au cours du cycle, c'est le cas pour les gènes *rds1*, *eng1* et *cdc22*. Le complexe condensine s'associe à la chromatine également au niveau des gènes régulés au cours du cycle cellulaire chez les vertébrés (J. H. Kim et al. 2013). Nos résultats montrent qu'une diminution de H3K9ac, H3K14ac et H3K18ac sur un site peut coïncider avec une diminution de l'association de condensine en ce même site, ce qui suggère que le niveau d'acétylation de H3 faciliterait l'association de condensine à la chromatine en certains sites.

Le fait que cette règle ne soit pas généralisable sur l'ensemble du génome peut être expliqué par le fait qu'évolutivement, le complexe condensine pré-date des histones. De même, le lien entre l'association de condensine à la chromatine avec les facteurs de transcription est antérieur à l'apparition des histones, ce qui suggère que les histones ne sont pas des recruteurs universels de condensine. Suivant ce raisonnement, condensine ne serait pas recrutée directement par les histones elles même, mais les modifications post traductionnelles des histones faciliter le recrutement des facteurs de transcription sur la chromatine nécessaire au chargement de condensine sur les chromosomes.

Lien entre la condensation mitotique et la transcription

La transcription est corrélée à l'ouverture transitoire de la chromatine. Le complexe condensine serait fonction du programme transcriptionnel mais varierait en fonction du développement. L'architecture entre chromosomes de cellules embryonnaires est différente de celle des chromosomes somatiques (Micheli et al. 1993). La principale différence entre ces deux types de cellules est le programme transcriptionnel. Une hypothèse serait que la programmation transcriptionnel au cours de la différenciation cellulaire aurait une incidence sur l'accessibilité des sites d'association de condensine.

La persistance durant la mitose de modifications activant la transcription et/ou la présence de facteurs de transcription sur la chromatine est décrite sous le terme de « *gene bookmarking* » (F. Wang et Higgins 2013). Ces marques stables agiraient comme les signaux moléculaires d'une mémoire épigénétique de la transcription, permettant aux cellules filles de ré-engager le programme transcriptionnel de leur cellule mère au sortir de la mitose. Les traces de H3K9ac en mitose persistantes participeraient à la mémoire épigénétique de la transcription et aux recrutements de condensine à la chromatine. Ces marques épigénétiques pourraient servir de point d'ancrage de condensine à la chromatine, et par conséquent déterminer l'architecture du chromosome mitotique en fonction du programme transcriptionnel de la cellule.

Pour tester cette hypothèse, chez la levure *S. pombe*, une expérience serait de tester l'enrichissement de condensine à la chromatine en fonction du milieu de croissance sur lequel les cellules sont cultivées (milieu complet à partir de Yeast Extract contre milieu synthétique PMG).

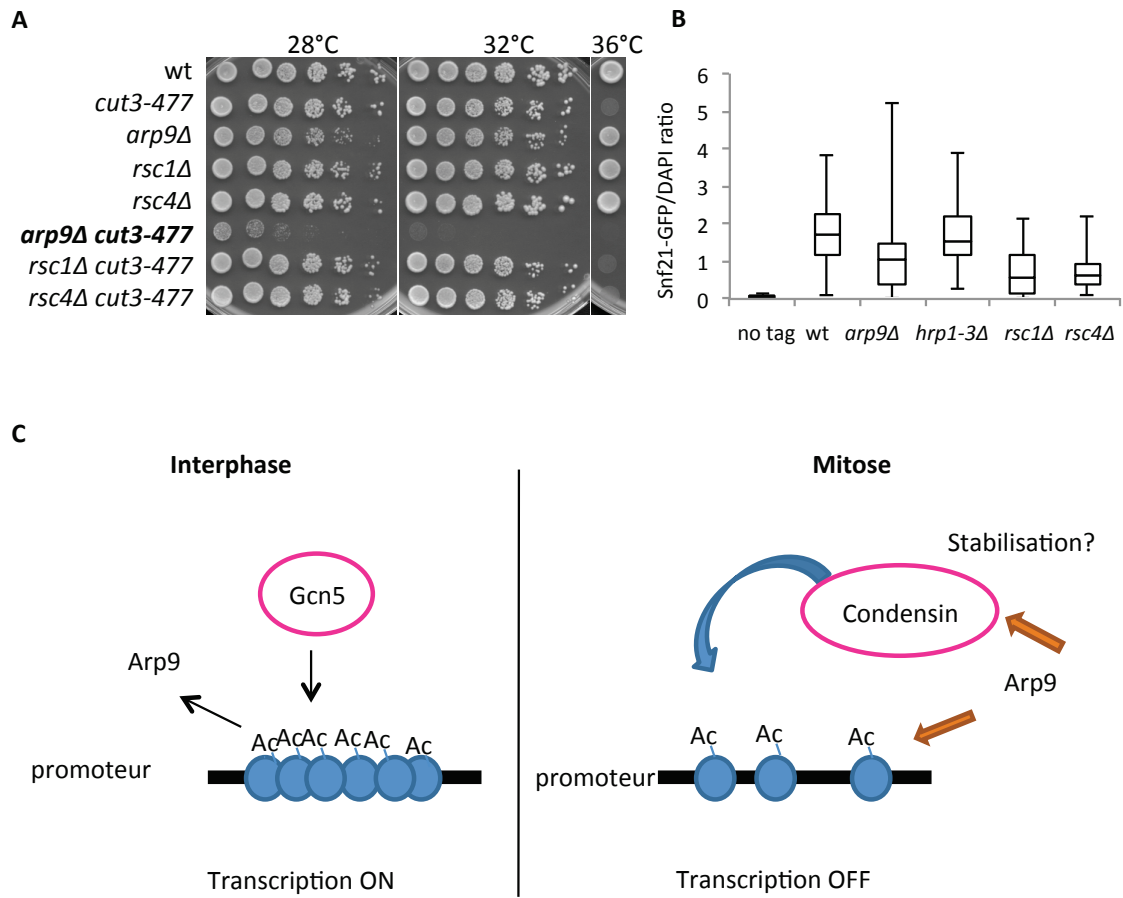


Figure 53. Lien entre le remodelage de la chromatine et l'association de condensine à la chromatine. A. Interaction entre *arp9Δ* et *cut3-477* A. Quantification de Snf21-GFP par étalement des chromosomes, le mutant *hrp1-3Δ* sert un contrôle de spécificité. C. Modèle d'association de condensine à la chromatine via Arp9, Gcn5 et l'acétylation des histones H3K9, H3K14 et H3K18.

Rôle de Gcn5 via le remodelage de la chromatine.

Le modèle proposé à l'issu de mes travaux serait le suivant (Figure 53C) : en interphase, Gcn5 acétyle les histones H3K9, H3K14 et H3K18 au niveau des promoteurs des gènes actifs afin de faciliter la transcription. Condensine à ce moment, est principalement cytoplasmique. En entrée en mitose, la transcription est diminuée, le gros de la chromatine est dé-acétylée mais des traces de H3 acétylée vont persister au niveau des promoteurs. Et ces marques épigénétiques interagissent directement ou indirectement avec condensine pour faciliter son association en ces sites.

L'acétylation de H3K14 par Gcn5 facilite le recrutement du complexe de remodelage de la chromatine RSC (Snf21, Rsc4) à la chromatine (Wang 2012). J'ai confirmé que la protéine Arp9, dont la perte de fonction est colétale avec *cut3-477* est requise à l'association de Snf21 à la chromatine (Figure 53C). De plus, nos résultats montrent que chez les mutants *gcn5* la présence de H3 est augmentée au niveau des sites d'association de condensine à la chromatine (données non-montrées). Une hypothèse est que la présence de ces nucléosomes en grand nombre est un obstacle à la fixation de condensine sur la chromatine. Ainsi, les traces de H3ac persistant sur la chromatine en mitose faciliteraient le recrutement de condensine à chromatine via le recrutement des facteurs de remodelage de la chromatine, tel que le complexe RSC. Ce complexe permettrait de rendre la chromatine plus accessible au complexe condensine par éviction ou déplacement des nucléosomes (Figure 53C).

Les nucléosomes ne seraient pas des récepteurs pour les condensines mais plutôt des obstacles. Les condensines se fixeraient préférentiellement à proximité des gènes fortement transcrits car l'ADN chromosomique serait plus accessible au niveau de leurs promoteurs pauvres en nucléosomes. Le lien conservé chez les eucaryotes entre une forte activité transcriptionnelle et la fixation des condensines serait la présence et/ou le maintien de régions accessibles, pauvres en nucléosomes. Cependant, ce modèle n'explique pas le biais de localisation observé chez les bactéries. Il ne s'agirait donc que d'un aspect du lien entre transcription et fixation des condensines sur les chromosomes.

Bibliographie

- Abe, Satoshi, Kota Nagasaka, Youko Hirayama, Hiroko Kozuka-Hata, Masaaki Oyama, Yutaka Aoyagi, Chikashi Obuse, et Toru Hirota. 2011. « The Initial Phase of Chromosome Condensation Requires Cdk1-Mediated Phosphorylation of the CAP-D3 Subunit of Condensin II ». *Genes & Development* 25 (8): 863-874. doi:10.1101/gad.2016411.
- Akai, Yuko, Yumiko Kurokawa, Norihiko Nakazawa, Yuko Tonami-Murakami, Yuki Suzuki, Shige H. Yoshimura, Hiroshi Iwasaki, et al. 2011. « Opposing Role of Condensin Hinge against Replication Protein A in Mitosis and Interphase through Promoting DNA Annealing ». *Open Biology* 1 (4): 110023. doi:10.1098/rsob.110023.
- Anders, Andreas, Stephen Watt, Jürg Bähler, et Kenneth E. Sawin. 2008. « Improved Tools for Efficient Mapping of Fission Yeast Genes: Identification of Microtubule Nucleation Modifier mod22-1 as an Allele of Chromatin- Remodelling Factor Gene *swr1* ». *Yeast* 25 (12): 913-925. doi:10.1002/yea.1639.
- 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): 419-424. doi:10.1083/jcb.200111002.
- Aono, Nobuki, Takashi Sutani, Takeshi Tomonaga, Satoru Mochida, et Mitsuhiro Yanagida. 2002. « Cnd2 Has Dual Roles in Mitotic Condensation and Interphase ». *Nature* 417 (6885): 197-202. doi:10.1038/417197a.
- Arents, G, R W Burlingame, B C Wang, W E Love, et E N Moudrianakis. 1991. « The Nucleosomal Core Histone Octamer at 3.1 Å Resolution: A Tripartite Protein Assembly and a Left-Handed Superhelix ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88 (22): 10148-10152.
- Barbet, N, W J Muriel, et A M Carr. 1992. « Versatile Shuttle Vectors and Genomic Libraries for Use with *Schizosaccharomyces Pombe* ». *Gene* 114 (1): 59-66.
- Bardin, Allison J., et Angelika Amon. 2001. « MEN and SIN: What's the Difference? ». *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2 (11): 815-826. doi:10.1038/35099020.
- Basi, G, E Schmid, et K Maundrell. 1993. « TATA Box Mutations in the *Schizosaccharomyces Pombe* *nmt1* Promoter Affect Transcription Efficiency but Not the Transcription Start Point or Thiamine Repressibility ». *Gene* 123 (1): 131-136.
- Baxevanis, A. D., et D. Landsman. 1998. « Histone Sequence Database: New Histone Fold Family Members ». *Nucleic Acids Research* 26 (1): 372-375.

- Baxter, J., N. Sen, V. López Martínez, M. E. Monturus De Carandini, J. B. Schwartzman, J. F. X. Diffley, et L. Aragón. 2011. « Positive Supercoiling of Mitotic DNA Drives Decatenation by Topoisomerase II in Eukaryotes ». *Science (New York, N.Y.)* 331 (6022): 1328-1332. doi:10.1126/science.1201538.
- Baxter, Jonathan, et Luis Aragón. 2012. « A Model for Chromosome Condensation Based on the Interplay between Condensin and Topoisomerase II ». *Trends in Genetics: TIG* 28 (3): 110-117. doi:10.1016/j.tig.2011.11.004.
- Bazile, Franck, Julie St-Pierre, et Damien D'Amours. 2010. « Three-Step Model for Condensin Activation during Mitotic Chromosome Condensation ». *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)* 9 (16): 3243-3255. doi:10.4161/cc.9.16.12620.
- Bedhomme, Mariette, Stefan Jouannic, Antony Champion, Viesturs Simanis, et Yves Henry. 2008. « Plants, MEN and SIN ». *Plant Physiology and Biochemistry* 46 (1): 1-10. doi:10.1016/j.plaphy.2007.10.010.
- Belmont, A. S., et K. Bruce. 1994. « Visualization of G1 Chromosomes: A Folded, Twisted, Supercoiled Chromonema Model of Interphase Chromatid Structure ». *The Journal of Cell Biology* 127 (2): 287-302.
- Belmont, Andrew S. 2002. « Mitotic Chromosome Scaffold Structure: New Approaches to an Old Controversy ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99 (25): 15855-15857. doi:10.1073/pnas.262672799.
- Bembenek, Joshua N., Koen J. C. Verbrugghe, Jayshree Khanikar, Györgyi Csankovszki, et Raymond C. Chan. 2013. « Condensin and the Spindle Midzone Prevent Cytokinesis Failure Induced by Chromatin Bridges in *C. Elegans* Embryos ». *Current Biology: CB* 23 (11): 937-946. doi:10.1016/j.cub.2013.04.028.
- Bentley, N J, D A Holtzman, G Flaggs, K S Keegan, A DeMaggio, J C Ford, M Hoekstra, et A M Carr. 1996. « The Schizosaccharomyces Pombe rad3 Checkpoint Gene ». *The EMBO Journal* 15 (23): 6641-6651.
- Bernard, Pascal, Julie Drogat, Sonia Dheur, Sylvie Genier, et Jean-Paul Javerzat. 2010. « Splicing Factor Spf30 Assists Exosome-Mediated Gene Silencing in Fission Yeast ». *Molecular and Cellular Biology* 30 (5): 1145-1157. doi:10.1128/MCB.01317-09.
- Bhalla, Needhi, Sue Biggins, et Andrew W. Murray. 2002. « Mutation of YCS4, a Budding Yeast Condensin Subunit, Affects Mitotic and Nonmitotic Chromosome Behavior ». *Molecular Biology of the Cell* 13 (2): 632-645. doi:10.1091/mbc.01-05-0264.

- Bian, Chuanbing, Chao Xu, Jianbin Ruan, Kenneth K Lee, Tara L Burke, Wolfram Tempel, Dalia Barsyte, et al. 2011. « Sgf29 Binds Histone H3K4me2/3 and Is Required for SAGA Complex Recruitment and Histone H3 Acetylation ». *The EMBO Journal* 30 (14): 2829-2842. doi:10.1038/emboj.2011.193.
- Bickmore, Wendy A., et Bas van Steensel. 2013. « Genome Architecture: Domain Organization of Interphase Chromosomes ». *Cell* 152 (6): 1270-1284. doi:10.1016/j.cell.2013.02.001.
- Brito, Ilana L., Hong-Guo Yu, et Angelika Amon. 2010. « Condensins Promote Coorientation of Sister Chromatids during Meiosis I in Budding Yeast ». *Genetics* 185 (1): 55-64. doi:10.1534/genetics.110.115139.
- Brownell, J E, et C D Allis. 1995. « An Activity Gel Assay Detects a Single, Catalytically Active Histone Acetyltransferase Subunit in Tetrahymena Macronuclei ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92 (14): 6364-6368.
- Brownell, James E., Jianxin Zhou, Tamara Ranalli, Ryuji Kobayashi, Diane G. Edmondson, Sharon Y. Roth, et C. David Allis. 1996. « Tetrahymena Histone Acetyltransferase A: A Homolog to Yeast Gcn5p Linking Histone Acetylation to Gene Activation ». *Cell* 84 (6): 843-851. doi:10.1016/S0092-8674(00)81063-6.
- Buttrick, Graham J., John C. Meadows, Theresa C. Lancaster, Vincent Vanoosthuyse, Lindsey A. Shepperd, Kwang-Lae Hoe, Dong-Uk Kim, Han-Oh Park, Kevin G. Hardwick, et Jonathan B. A. Millar. 2011. « Nsk1 Ensures Accurate Chromosome Segregation by Promoting Association of Kinetochores to Spindle Poles during Anaphase B ». *Molecular Biology of the Cell* 22 (23): 4486-4502. doi:10.1091/mbc.E11-07-0608.
- Cai, Ling, Benjamin M Sutter, Bing Li, et Benjamin P Tu. 2011. « Acetyl-CoA Induces Cell Growth and Proliferation by Promoting the Acetylation of Histones at Growth Genes ». *Molecular Cell* 42 (4): 426-437. doi:10.1016/j.molcel.2011.05.004.
- Cairns, Bradley R, Hediye Erdjument-Bromage, Paul Tempst, Fred Winston, et Roger D Kornberg. 1998. « Two Actin-Related Proteins Are Shared Functional Components of the Chromatin-Remodeling Complexes RSC and SWI/SNF ». *Molecular Cell* 2 (5): 639-651. doi:10.1016/S1097-2765(00)80162-8.
- Carré, Clément, Dimitri Szymczak, Josette Pidoux, et Christophe Antoniewski. 2005. « The Histone H3 Acetylase dGcn5 Is a Key Player in Drosophila Melanogaster Metamorphosis ». *Molecular and Cellular Biology* 25 (18): 8228-8238.

doi:10.1128/MCB.25.18.8228-8238.2005.

Castaño, I. B., P. M. Brzoska, B. U. Sadoff, H. Chen, et M. F. Christman. 1996. « Mitotic Chromosome Condensation in the rDNA Requires TRF4 and DNA Topoisomerase I in *Saccharomyces Cerevisiae* ». *Genes & Development* 10 (20): 2564-2576.

Chen, Chun-Ting, Heidi Hehnly, et Stephen J. Doxsey. 2012. « Orchestrating Vesicle Transport, ESCRTs and Kinase Surveillance during Abscission ». *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 13 (8): 483-488. doi:10.1038/nrm3395.

Chen, Danyang, Miroslav Dundr, Chen Wang, Anthony Leung, Angus Lamond, Tom Misteli, et Sui Huang. 2005. « Condensed Mitotic Chromatin Is Accessible to Transcription Factors and Chromatin Structural Proteins ». *The Journal of Cell Biology* 168 (1): 41-54. doi:10.1083/jcb.200407182.

Chen, Mingming, et Xuotong Shen. 2007. « Nuclear actin and actin-related proteins in chromatin dynamics ». *Current Opinion in Cell Biology, Nucleus and Gene Expression*, 19 (3): 326-330. doi:10.1016/j.ceb.2007.04.009.

Choudhary, Chunaram, Chanchal Kumar, Florian Gnäd, Michael L Nielsen, Michael Rehman, Tobias C Walther, Jesper V Olsen, et Matthias Mann. 2009. « Lysine Acetylation Targets Protein Complexes and Co-Regulates Major Cellular Functions ». *Science (New York, N.Y.)* 325 (5942): 834-840. doi:10.1126/science.1175371.

Clapier, Cedric R, et Bradley R Cairns. 2009. « The Biology of Chromatin Remodeling Complexes ». *Annual Review of Biochemistry* 78: 273-304. doi:10.1146/annurev.biochem.77.062706.153223.

Clemente-Blanco, Andrés, María Mayán-Santos, David A Schneider, Félix Machín, Adam Jarmuz, Herbert Tschochner, et Luis Aragón. 2009. « Cdc14 Inhibits Transcription by RNA Polymerase I during Anaphase ». *Nature* 458 (7235): 219-222. doi:10.1038/nature07652.

Clemente-Blanco, Andres, Nicholas Sen, Maria Mayan-Santos, Maria P Sacristán, Bryony Graham, Adam Jarmuz, Adam Giess, et al. 2011. « Cdc14 Phosphatase Promotes Segregation of Telomeres through Repression of RNA Polymerase II Transcription ». *Nature Cell Biology* 13 (12): 1450-1456. doi:10.1038/ncb2365.

Clute, P, et J Pines. 1999. « Temporal and Spatial Control of Cyclin B1 Destruction in Metaphase ». *Nature Cell Biology* 1 (2): 82-87. doi:10.1038/10049.

Conaway, Ronald C., et Joan Weliky Conaway. 2011. « Function and Regulation of the Mediator Complex ». *Current Opinion in Genetics & Development* 21 (2): 225-230.

doi:10.1016/j.gde.2011.01.013.

Corbett, Kevin D., Calvin K. Yip, Ly-Sha Ee, Thomas Walz, Angelika Amon, et Stephen C. Harrison. 2010. « The Monopolin Complex Crosslinks Kinetochore Components to Regulate Chromosome-Microtubule Attachments ». *Cell* 142 (4): 556-567. doi:10.1016/j.cell.2010.07.017.

Coschi, Courtney H, Alison L Martens, Kieran Ritchie, Sarah M Francis, Subrata Chakrabarti, Nathalie G Berube, et Frederick A Dick. 2010. « Mitotic Chromosome Condensation Mediated by the Retinoblastoma Protein Is Tumor-Suppressive ». *Genes & Development* 24 (13): 1351-1363. doi:10.1101/gad.1917610.

Csankovszki, Györgyi, Emily L. Petty, et Karishma S. Collette. 2009. « The Worm Solution: A Chromosome-Full of Condensin Helps Gene Expression Go down ». *Chromosome Research: An International Journal on the Molecular, Supramolecular and Evolutionary Aspects of Chromosome Biology* 17 (5): 621-635. doi:10.1007/s10577-009-9061-y.

Cuylen, Sara, Jutta Metz, et Christian H Haering. 2011. « Condensin Structures Chromosomal DNA through Topological Links ». *Nature Structural & Molecular Biology* 18 (8): 894-901. doi:10.1038/nsmb.2087.

Cuylen, Sara, Jutta Metz, Andrea Hraby, et Christian H. Haering. 2013. « Entrapment of Chromosomes by Condensin Rings Prevents Their Breakage during Cytokinesis ». *Developmental Cell* 27 (4): 469-478. doi:10.1016/j.devcel.2013.10.018.

D'Ambrosio, Claudio, Christine Katrin Schmidt, Yuki Katou, Gavin Kelly, Takehiko Itoh, Katsuhiko Shirahige, et Frank Uhlmann. 2008. « Identification of Cis-Acting Sites for Condensin Loading onto Budding Yeast Chromosomes ». *Genes & Development* 22 (16): 2215-2227. doi:10.1101/gad.1675708.

D'Amours, D, S Desnoyers, I D'Silva, et G G Poirier. 1999. « Poly(ADP-Ribosyl)ation Reactions in the Regulation of Nuclear Functions ». *The Biochemical Journal* 342 (Pt 2) (septembre): 249-268.

D'Amours, Damien, et Angelika Amon. 2004. « At the Interface between Signaling and Executing Anaphase--Cdc14 and the FEAR Network ». *Genes & Development* 18 (21): 2581-2595. doi:10.1101/gad.1247304.

D'Amours, Damien, Frank Stegmeier, et Angelika Amon. 2004. « Cdc14 and Condensin Control the Dissolution of Cohesin-Independent Chromosome Linkages at Repeated DNA ». *Cell* 117 (4): 455-469. doi:10.1016/S0092-8674(04)00413-1.

Daniel, Jeremy A., et Patrick A. Grant. 2007. « Multi-Tasking on Chromatin with the SAGA

- Coactivator Complexes ». *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 618 (1-2): 135-148. doi:10.1016/j.mrfmmm.2006.09.008.
- Davis, T. L., et B. J. Meyer. 1997. « SDC-3 Coordinates the Assembly of a Dosage Compensation Complex on the Nematode X Chromosome ». *Development (Cambridge, England)* 124 (5): 1019-1031.
- Dawes, H. E., D. S. Berlin, D. M. Lapidus, C. Nusbaum, T. L. Davis, et B. J. Meyer. 1999. « Dosage Compensation Proteins Targeted to X Chromosomes by a Determinant of Hermaphrodite Fate ». *Science (New York, N.Y.)* 284 (5421): 1800-1804.
- De Wulf, Peter, Francesca Montani, et Rosella Visintin. 2009. « Protein Phosphatases Take the Mitotic Stage ». *Current Opinion in Cell Biology* 21 (6): 806-815. doi:10.1016/j.ceb.2009.08.003.
- Downen, Jill M, Steve Bilodeau, David A Orlando, Michael R Hübner, Brian J Abraham, David L Spector, et Richard A Young. 2013. « Multiple Structural Maintenance of Chromosome Complexes at Transcriptional Regulatory Elements ». *Stem Cell Reports* 1 (5): 371-378. doi:10.1016/j.stemcr.2013.09.002.
- Eberharter, A, D E Sterner, D Schieltz, A Hassan, J R Yates 3rd, S L Berger, et J L Workman. 1999. « The ADA Complex Is a Distinct Histone Acetyltransferase Complex in *Saccharomyces Cerevisiae* ». *Molecular and Cellular Biology* 19 (10): 6621-6631.
- Forsburg, Susan L., et Nicholas Rhind. 2006. « Basic Methods for Fission Yeast ». *Yeast (Chichester, England)* 23 (3): 173-183. doi:10.1002/yea.1347.
- Freeman, L., L. Aragon-Alcaide, et A. Strunnikov. 2000. « The Condensin Complex Governs Chromosome Condensation and Mitotic Transmission of rDNA ». *The Journal of Cell Biology* 149 (4): 811-824.
- Gamper, Armin M, Jaehoon Kim, et Robert G Roeder. 2009. « The STAGA Subunit ADA2b Is an Important Regulator of Human GCN5 Catalysis ». *Molecular and Cellular Biology* 29 (1): 266-280. doi:10.1128/MCB.00315-08.
- Gauthier, Nicholas Paul, Lars Juhl Jensen, Rasmus Wernersson, Søren Brunak, et Thomas S. Jensen. 2010. « Cyclebase.org: Version 2.0, an Updated Comprehensive, Multi-Species Repository of Cell Cycle Experiments and Derived Analysis Results ». *Nucleic Acids Research* 38 (suppl 1): D699-D702. doi:10.1093/nar/gkp1044.
- Georgakopoulos, T., et G. Thireos. 1992. « Two Distinct Yeast Transcriptional Activators Require the Function of the GCN5 Protein to Promote Normal Levels of Transcription. » *The EMBO Journal* 11 (11): 4145.

- Georgieva, Milena, Assen Roguev, Konstantin Balashev, Jordanka Zlatanova, et George Miloshev. 2012. « Hho1p, the Linker Histone of *Saccharomyces Cerevisiae*, Is Important for the Proper Chromatin Organization in Vivo ». *Biochimica Et Biophysica Acta* 1819 (5): 366-374. doi:10.1016/j.bbagr.2011.12.003.
- Gerlich, Daniel, Toru Hirota, Birgit Koch, Jan-Michael Peters, et Jan Ellenberg. 2006. « Condensin I Stabilizes Chromosomes Mechanically through a Dynamic Interaction in Live Cells ». *Current Biology: CB* 16 (4): 333-344. doi:10.1016/j.cub.2005.12.040.
- Giet, R., et D. 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): 669-682.
- Govind, Chhabi K, Fan Zhang, Hongfang Qiu, Kimberly Hofmeyer, et Alan G Hinnebusch. 2007. « Gcn5 Promotes Acetylation, Eviction, and Methylation of Nucleosomes in Transcribed Coding Regions ». *Molecular Cell* 25 (1): 31-42. doi:10.1016/j.molcel.2006.11.020.
- Grant, P A, S L Berger, et J L Workman. 1999. « Identification and Analysis of Native Nucleosomal Histone Acetyltransferase Complexes ». *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* 119: 311-317. doi:10.1385/1-59259-681-9:311.
- Grant, P A, L Duggan, J Côté, S M Roberts, J E Brownell, R Candau, R Ohba, et al. 1997. « Yeast Gcn5 Functions in Two Multisubunit Complexes to Acetylate Nucleosomal Histones: Characterization of an Ada Complex and the SAGA (Spt/Ada) Complex ». *Genes & Development* 11 (13): 1640-1650.
- Graumann, Peter L., et Tobias Knust. 2009. « Dynamics of the Bacterial SMC Complex and SMC-like Proteins Involved in DNA Repair ». *Chromosome Research* 17 (2): 265-275. doi:10.1007/s10577-008-9014-x.
- Green, Lydia C., Paul Kalitsis, Tsz M. Chang, Miri Cipetic, Ji Hun Kim, Owen Marshall, Lynne Turnbull, et al. 2012. « Contrasting Roles of Condensin I and Condensin II in Mitotic Chromosome Formation ». *Journal of Cell Science* 125 (Pt 6): 1591-1604. doi:10.1242/jcs.097790.
- Gregan, Juraj, Silvia Polakova, Lijuan Zhang, Iva M Tolić-Nørrelykke, et Daniela Cimini. 2011. « Merotelic Kinetochore Attachment: Causes and Effects ». *Trends in Cell Biology* 21 (6): 374-381. doi:10.1016/j.tcb.2011.01.003.

- Gregan, Juraj, Christian G Riedel, Alison L Pidoux, Yuki Katou, Cornelia Rumpf, Alexander Schleiffer, Stephen E Kearsey, Katsuhiko Shirahige, Robin C Allshire, et Kim Nasmyth. 2007. « The Kinetochore Proteins Pcs1 and Mde4 and Heterochromatin Are Required to Prevent Merotelic Orientation ». *Current Biology: CB* 17 (14): 1190-1200. doi:10.1016/j.cub.2007.06.044.
- Gruber, Stephan, Prakash Arumugam, Yuki Katou, Daria Kuglitsch, Wolfgang Helmhart, Katsuhiko Shirahige, et Kim Nasmyth. 2006. « Evidence That Loading of Cohesin onto Chromosomes Involves Opening of Its SMC Hinge ». *Cell* 127 (3): 523-537. doi:10.1016/j.cell.2006.08.048.
- 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): 685-696. doi:10.1016/j.cell.2009.02.035.
- Grunstein, M. 1997. « Histone Acetylation in Chromatin Structure and Transcription ». *Nature* 389 (6649): 349-352. doi:10.1038/38664.
- Guelman, Sebastián, Kenji Kozuka, Yifan Mao, Victoria Pham, Mark J Solloway, John Wang, Jiansheng Wu, Jennie R Lill, et Jiping Zha. 2009. « The Double-Histone-Acetyltransferase Complex ATAC Is Essential for Mammalian Development ». *Molecular and Cellular Biology* 29 (5): 1176-1188. doi:10.1128/MCB.01599-08.
- Guelman, Sebastián, Tamaki Suganuma, Laurence Florens, Selene K. Swanson, Cheri L. Kiesecker, Thomas Kusch, Scott Anderson, et al. 2006. « Host Cell Factor and an Uncharacterized SANT Domain Protein Are Stable Components of ATAC, a Novel dAda2A/dGcn5-Containing Histone Acetyltransferase Complex in *Drosophila* ». *Molecular and Cellular Biology* 26 (3): 871-882. doi:10.1128/MCB.26.3.871-882.2006.
- Gurard-Levin, Zachary A., Jean-Pierre Quivy, et Geneviève Almouzni. 2014. « Histone Chaperones: Assisting Histone Traffic and Nucleosome Dynamics ». *Annual Review of Biochemistry* 83 (juin): 487-517. doi:10.1146/annurev-biochem-060713-035536.
- 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): 773-788.
- Haeusler, Rebecca A., Matthew Pratt-Hyatt, Paul D. Good, Theresa A. Gipson, et David R. Engelke. 2008. « Clustering of Yeast tRNA Genes Is Mediated by Specific Association of Condensin with tRNA Gene Transcription Complexes ». *Genes & Development* 22 (16):

2204-2214. doi:10.1101/gad.1675908.

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): 729-742. doi:10.1101/gad.968302.

Hans, F, et S Dimitrov. 2001. « Histone H3 Phosphorylation and Cell Division ». *Oncogene* 20 (24): 3021-3027. doi:10.1038/sj.onc.1204326.

Hassan, Ahmed H, Salma Awad, et Philippe Prochasson. 2006. « The Swi2/Snf2 Bromodomain Is Required for the Displacement of SAGA and the Octamer Transfer of SAGA-Acetylated Nucleosomes ». *The Journal of Biological Chemistry* 281 (26): 18126-18134. doi:10.1074/jbc.M602851200.

Hassan, Ahmed H, Philippe Prochasson, Kristen E Neely, Scott C Galasinski, Mark Chandy, Michael J Carrozza, et Jerry L Workman. 2002. « Function and Selectivity of Bromodomains in Anchoring Chromatin-Modifying Complexes to Promoter Nucleosomes ». *Cell* 111 (3): 369-379.

Hassan, Ahmed H., Salma Awad, Zeina Al-Natour, Samah Othman, Farah Mustafa, et Tahir A. Rizvi. 2007. « Selective recognition of acetylated histones by bromodomains in transcriptional co-activators ». *Biochemical Journal* 402 (1): 125. doi:10.1042/BJ20060907.

Heale, Jason T., Alexander R. Ball, John A. Schmiesing, Jong-Soo Kim, Xiangduo Kong, Sharleen Zhou, Damien F. Hudson, William C. Earnshaw, et Kyoko Yokomori. 2006. « Condensin I Interacts with the PARP-1-XRCC1 Complex and Functions in DNA Single-Strand Break Repair ». *Molecular Cell* 21 (6): 837-848. doi:10.1016/j.molcel.2006.01.036.

Helmlinger, Dominique, Samuel Marguerat, Judit Villén, Steven P Gygi, Jürg Bähler, et Fred Winston. 2008. « The S. Pombe SAGA Complex Controls the Switch from Proliferation to Sexual Differentiation through the Opposing Roles of Its Subunits Gcn5 and Spt8 ». *Genes & Development* 22 (22): 3184-3195. doi:10.1101/gad.1719908.

Helmlinger, Dominique, Samuel Marguerat, Judit Villén, Danielle L Swaney, Steven P Gygi, Jürg Bähler, et Fred Winston. 2011. « Tra1 Has Specific Regulatory Roles, rather than Global Functions, within the SAGA Co-Activator Complex ». *The EMBO Journal* 30 (14): 2843-2852. doi:10.1038/emboj.2011.181.

Henzel, M. J., Y. Wei, M. A. Mancini, A. Van Hooser, T. Ranalli, B. R. Brinkley, D. P. Bazett-

- Jones, et C. D. Allis. 1997. « Mitosis-Specific Phosphorylation of Histone H3 Initiates Primarily within Pericentromeric Heterochromatin during G2 and Spreads in an Ordered Fashion Coincident with Mitotic Chromosome Condensation ». *Chromosoma* 106 (6): 348-360.
- Henry, Karl W, Anastasia Wyce, Wan-Sheng Lo, Laura J Duggan, N C Tolga Emre, Cheng-Fu Kao, Lorraine Pillus, Ali Shilatifard, Mary Ann Osley, et Shelley L Berger. 2003. « Transcriptional Activation via Sequential Histone H2B Ubiquitylation and Deubiquitylation, Mediated by SAGA-Associated Ubp8 ». *Genes & Development* 17 (21): 2648-2663. doi:10.1101/gad.1144003.
- Hihara, Saera, Chan-Gi Pack, Kazunari Kaizu, Tomomi Tani, Tomo Hanafusa, Tadasu Nozaki, Satoko Takemoto, et al. 2012. « Local Nucleosome Dynamics Facilitate Chromatin Accessibility in Living Mammalian Cells ». *Cell Reports* 2 (6): 1645-1656. doi:10.1016/j.celrep.2012.11.008.
- Hirano, Michiko, et Tatsuya Hirano. 2002. « Hinge-Mediated Dimerization of SMC Protein Is Essential for Its Dynamic Interaction with DNA ». *The EMBO Journal* 21 (21): 5733-5744.
- . 2006. « Opening Closed Arms: Long-Distance Activation of SMC ATPase by Hinge-DNA Interactions ». *Molecular Cell* 21 (2): 175-186. doi:10.1016/j.molcel.2005.11.026.
- Hirano, T, R Kobayashi, et M Hirano. 1997. « Condensins, Chromosome Condensation Protein Complexes Containing XCAP-C, XCAP-E and a Xenopus Homolog of the Drosophila Barren Protein ». *Cell* 89 (4): 511-521.
- Hirano, Tatsuya. 2005. « Condensins: Organizing and Segregating the Genome ». *Current Biology: CB* 15 (7): R265-275. doi:10.1016/j.cub.2005.03.037.
- . 2006. « At the Heart of the Chromosome: SMC Proteins in Action ». *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 7 (5): 311-322. doi:10.1038/nrm1909.
- . 2012a. « Chromosome Territories Meet a Condensin ». *PLoS Genetics* 8 (8): e1002939. doi:10.1371/journal.pgen.1002939.
- . 2012b. « Condensins: Universal Organizers of Chromosomes with Diverse Functions ». *Genes & Development* 26 (15): 1659-1678. doi:10.1101/gad.194746.112.
- Hiraoka, Y., T. Toda, et M. Yanagida. 1984. « The NDA3 Gene of Fission Yeast Encodes Beta-Tubulin: A Cold-Sensitive nda3 Mutation Reversibly Blocks Spindle Formation and Chromosome Movement in Mitosis ». *Cell* 39 (2 Pt 1): 349-358.

- Hirota, Toru, Daniel Gerlich, Birgit Koch, Jan Ellenberg, et Jan-Michael Peters. 2004. « Distinct Functions of Condensin I and II in Mitotic Chromosome Assembly ». *Journal of Cell Science* 117 (Pt 26): 6435-6445. doi:10.1242/jcs.01604.
- Houseley, Jonathan, John LaCava, et David Tollervey. 2006. « RNA-Quality Control by the Exosome ». *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 7 (7): 529-539. doi:10.1038/nrm1964.
- Hsu, Jing-Mei, Jian Huang, Pamela B. Meluh, et Brehon C. Laurent. 2003. « The Yeast RSC Chromatin-Remodeling Complex Is Required for Kinetochore Function in Chromosome Segregation ». *Molecular and Cellular Biology* 23 (9): 3202-3215.
- Huang, Jian, Jing-Mei Hsu, et Brehon C. Laurent. 2004. « The RSC Nucleosome-Remodeling Complex Is Required for Cohesin's Association with Chromosome Arms ». *Molecular Cell* 13 (5): 739-750.
- Hudson, Damien F., Kathryn M. Marshall, et William C. Earnshaw. 2009. « Condensin: Architect of Mitotic Chromosomes ». *Chromosome Research* 17 (2): 131-144. doi:10.1007/s10577-008-9009-7.
- Hudson, Damien F., Shinya Ohta, Tina Freisinger, Fiona Macisaac, Lau Sennels, Flavia Alves, Fan Lai, Alastair Kerr, Juri Rappsilber, et William C. Earnshaw. 2008. « Molecular and Genetic Analysis of Condensin Function in Vertebrate Cells ». *Molecular Biology of the Cell* 19 (7): 3070-3079. doi:10.1091/mbc.E08-01-0057.
- Iwasaki, Osamu, Atsunari Tanaka, Hideki Tanizawa, Shiv I. S. Grewal, et Ken-Ichi Noma. 2010. « Centromeric Localization of Dispersed Pol III Genes in Fission Yeast ». *Molecular Biology of the Cell* 21 (2): 254-265. doi:10.1091/mbc.E09-09-0790.
- Jeppesen, C., et P. E. Nielsen. 1989. « Photofootprinting of Drug-Binding Sites on DNA Using Diazo- and Azido-9-Aminoacridine Derivatives ». *European Journal of Biochemistry / FEBS* 182 (2): 437-444.
- Johnsson, Anna, Mickaël Durand-Dubief, Yongtao Xue-Franzén, Michelle Rönnerblad, Karl Ekwall, et Anthony Wright. 2009. « HAT-HDAC Interplay Modulates Global Histone H3K14 Acetylation in Gene-Coding Regions during Stress ». *EMBO Reports* 10 (9): 1009-1014. doi:10.1038/embor.2009.127.
- Kagey, Michael H., Jamie J. Newman, Steve Bilodeau, Ye Zhan, David A. Orlando, Nynke L. van Berkum, Christopher C. Ebmeier, et al. 2010. « Mediator and Cohesin Connect Gene Expression and Chromatin Architecture ». *Nature* 467 (7314): 430-435.

doi:10.1038/nature09380.

Kao, Li, Yi-Ting Wang, Yu-Chen Chen, Shun-Fu Tseng, Jia-Cin Jhang, Yu-Ju Chen, et Shu-Chun Teng. 2014. « Global Analysis of cdc14 Dephosphorylation Sites Reveals Essential Regulatory Role in Mitosis and Cytokinesis ». *Molecular & Cellular Proteomics: MCP* 13 (2): 594-605. doi:10.1074/mcp.M113.032680.

Kim, Hyun-Soo, Rituparna Mukhopadhyay, Scott B. Rothbart, Andrea C. Silva, Vincent Vanoosthuyse, Ernest Radovani, Thomas Kislinger, et al. 2014. « Identification of a BET Family Bromodomain/Casein Kinase II/TAF-Containing Complex as a Regulator of Mitotic Condensin Function ». *Cell Reports* 6 (5): 892-905. doi:10.1016/j.celrep.2014.01.029.

Kim, Hyun-Soo, Vincent Vanoosthuyse, Jeffrey Fillingham, Assen Roguev, Stephen Watt, Thomas Kislinger, Alex Treyer, et al. 2009. « An Acetylated Form of Histone H2A.Z Regulates Chromosome Architecture in *Schizosaccharomyces Pombe* ». *Nature Structural & Molecular Biology* 16 (12): 1286-1293. doi:10.1038/nsmb.1688.

Kim, Jeong-Hoon, Anita Saraf, Laurence Florens, Michael Washburn, et Jerry L Workman. 2010. « Gcn5 Regulates the Dissociation of SWI/SNF from Chromatin by Acetylation of Swi2/Snf2 ». *Genes & Development* 24 (24): 2766-2771. doi:10.1101/gad.1979710.

Kim, Ji Hun, Tao Zhang, Nicholas C. Wong, Nadia Davidson, Jovana Maksimovic, Alicia Oshlack, William C. Earnshaw, Paul Kalitsis, et Damien F. Hudson. 2013. « Condensin I Associates with Structural and Gene Regulatory Regions in Vertebrate Chromosomes ». *Nature Communications* 4 (octobre). doi:10.1038/ncomms3537.

Kimura, K., M. Hirano, R. Kobayashi, et T. Hirano. 1998. « Phosphorylation and Activation of 13S Condensin by Cdc2 in Vitro ». *Science (New York, N.Y.)* 282 (5388): 487-490.

Kimura, K., et T. Hirano. 2000. « Dual Roles of the 11S Regulatory Subcomplex in Condensin Functions ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97 (22): 11972-11977. doi:10.1073/pnas.220326097.

Kireeva, Natashe, Margot Lakonishok, Igor Kireev, Tatsuya Hirano, et Andrew S Belmont. 2004. « Visualization of Early Chromosome Condensation: A Hierarchical Folding, Axial Glue Model of Chromosome Structure ». *The Journal of Cell Biology* 166 (6): 775-785. doi:10.1083/jcb.200406049.

Knutson, Bruce A, et Steven Hahn. 2011. « Domains of Tra1 Important for Activator Recruitment and Transcription Coactivator Functions of SAGA and NuA4 Complexes ». *Molecular and Cellular Biology* 31 (4): 818-831. doi:10.1128/MCB.00687-10.

- Kouskouti, Antigone, et Iannis Talianidis. 2005. « Histone Modifications Defining Active Genes Persist after Transcriptional and Mitotic Inactivation ». *The EMBO Journal* 24 (2): 347-357. doi:10.1038/sj.emboj.7600516.
- Koutelou, Evangelia, Calley L Hirsch, et Sharon Y R Dent. 2010. « Multiple Faces of the SAGA Complex ». *Current Opinion in Cell Biology* 22 (3): 374-382. doi:10.1016/j.ceb.2010.03.005.
- Kranz, Anna-Lena, Chen-Yu Jiao, Lara Heermans Winterkorn, Sarah Elizabeth Albritton, Maxwell Kramer, et Sevinç Ercan. 2013. « Genome-Wide Analysis of Condensin Binding in *Caenorhabditis Elegans* ». *Genome Biology* 14 (10): R112. doi:10.1186/gb-2013-14-10-r112.
- Krapp, A, S Schmidt, E Cano, et V Simanis. 2001. « *S. Pombe* cdc11p, Together with sid4p, Provides an Anchor for Septation Initiation Network Proteins on the Spindle Pole Body ». *Current Biology: CB* 11 (20): 1559-1568.
- Kruhlak, M J, M J Hendzel, W Fischle, N R Bertos, S Hameed, X J Yang, E Verdin, et D P Bazett-Jones. 2001. « Regulation of Global Acetylation in Mitosis through Loss of Histone Acetyltransferases and Deacetylases from Chromatin ». *The Journal of Biological Chemistry* 276 (41): 38307-38319. doi:10.1074/jbc.M100290200.
- Lachner, Monika, et Thomas Jenuwein. 2002. « The Many Faces of Histone Lysine Methylation ». *Current Opinion in Cell Biology* 14 (3): 286-298.
- Lavoie, Brigitte D., Eileen Hogan, et Doug Koshland. 2004. « In Vivo Requirements for rDNA Chromosome Condensation Reveal Two Cell-Cycle-Regulated Pathways for Mitotic Chromosome Folding ». *Genes & Development* 18 (1): 76-87. doi:10.1101/gad.1150404.
- Lavoie, Brigitte D., Eileen Hogan, et Douglas Koshland. 2002. « In Vivo Dissection of the Chromosome Condensation Machinery: Reversibility of Condensation Distinguishes Contributions of Condensin and Cohesin ». *The Journal of Cell Biology* 156 (5): 805-815. doi:10.1083/jcb.200109056.
- Lee, Jibak. 2013. « Roles of Cohesin and Condensin in Chromosome Dynamics during Mammalian Meiosis ». *The Journal of Reproduction and Development* 59 (5): 431-436.
- Lee, Jibak, Sugako Ogushi, Mitinori Saitou, et Tatsuya Hirano. 2011. « Condensins I and II Are Essential for Construction of Bivalent Chromosomes in Mouse Oocytes ». *Molecular Biology of the Cell* 22 (18): 3465-3477. doi:10.1091/mbc.E11-05-0423.
- Lee, Kenneth K, Mihaela E Sardi, Selene K Swanson, Joshua M Gilmore, Michael Torok,

- Patrick A Grant, Laurence Florens, Jerry L Workman, et Michael P Washburn. 2011. « Combinatorial Depletion Analysis to Assemble the Network Architecture of the SAGA and ADA Chromatin Remodeling Complexes ». *Molecular Systems Biology* 7: 503. doi:10.1038/msb.2011.40.
- Lejeune, Erwan, et Robin C. Allshire. 2011. « Common Ground: Small RNA Programming and Chromatin Modifications ». *Current Opinion in Cell Biology* 23 (3): 258-265. doi:10.1016/j.ceb.2011.03.005.
- Lenstra, Tineke L, Joris J Benschop, Taesoo Kim, Julia M Schulze, Nathalie A C H Brabers, Thanasis Margaritis, Loes A L van de Pasch, et al. 2011. « The Specificity and Topology of Chromatin Interaction Pathways in Yeast ». *Molecular Cell* 42 (4): 536-549. doi:10.1016/j.molcel.2011.03.026.
- Lewis, C. D., et U. K. Laemmli. 1982. « Higher Order Metaphase Chromosome Structure: Evidence for Metalloprotein Interactions ». *Cell* 29 (1): 171-181.
- Lindqvist, Arne, Verónica Rodríguez-Bravo, et René H Medema. 2009. « The Decision to Enter Mitosis: Feedback and Redundancy in the Mitotic Entry Network ». *The Journal of Cell Biology* 185 (2): 193-202. doi:10.1083/jcb.200812045.
- 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 (Pt 7): 1245-1255. doi:10.1242/jcs.03425.
- Liu, Wen, Bogdan Tanasa, Oksana V. Tyurina, Tian Yuan Zhou, Reto Gassmann, Wei Ting Liu, Kenneth A. Ohgi, et al. 2010. « PHF8 Mediates Histone H4 Lysine 20 Demethylation Events Involved in Cell Cycle Progression ». *Nature* 466 (7305): 508-512. doi:10.1038/nature09272.
- Liu, Xingkun, Ian McLeod, Scott Anderson, John R Yates 3rd, et Xiangwei He. 2005. « Molecular Analysis of Kinetochore Architecture in Fission Yeast ». *The EMBO Journal* 24 (16): 2919-2930. doi:10.1038/sj.emboj.7600762.
- Longworth, Michelle S., Anabel Herr, Jun-Yuan Ji, et Nicholas J. Dyson. 2008. « RBF1 Promotes Chromatin Condensation through a Conserved Interaction with the Condensin II Protein dCAP-D3 ». *Genes & Development* 22 (8): 1011-1024. doi:10.1101/gad.1631508.
- Longworth, Michelle S., James A. Walker, Endre Anderssen, Nam-Sung Moon, Andrew Gladden, Margarete M. S. Heck, Sridhar Ramaswamy, et Nicholas J. Dyson. 2012. « A Shared Role for RBF1 and dCAP-D3 in the Regulation of Transcription with

Consequences for Innate Immunity». *PLoS Genetics* 8 (4): e1002618. doi:10.1371/journal.pgen.1002618.

Lopez-Serra, Lidia, Armelle Lengronne, Vanessa Borges, Gavin Kelly, et Frank Uhlmann. 2013. « Budding Yeast Wapl Controls Sister Chromatid Cohesion Maintenance and Chromosome Condensation ». *Current Biology: CB* 23 (1): 64-69. doi:10.1016/j.cub.2012.11.030.

Losada, Ana. 2007. « Cohesin Regulation: Fashionable Ways to Wear a Ring ». *Chromosoma* 116 (4): 321-329. doi:10.1007/s00412-007-0104-x.

———. 2014. « Cohesin in Cancer: Chromosome Segregation and beyond ». *Nature Reviews Cancer* 14 (6): 389-393. doi:10.1038/nrc3743.

Losada, Ana, Michiko Hirano, et Tatsuya Hirano. 2002. « Cohesin Release Is Required for Sister Chromatid Resolution, but Not for Condensin-Mediated Compaction, at the Onset of Mitosis ». *Genes & Development* 16 (23): 3004-3016. doi:10.1101/gad.249202.

Luger, K, A W Mäder, R K Richmond, D F Sargent, et T J Richmond. 1997. « Crystal Structure of the Nucleosome Core Particle at 2.8 Å Resolution ». *Nature* 389 (6648): 251-260. doi:10.1038/38444.

Luger, Karolin, Mekonnen L. Dechassa, et David J. Tremethick. 2012. « New insights into nucleosome and chromatin structure: an ordered state or a disordered affair? ». *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 13 (7): 436-447. doi:10.1038/nrm3382.

MacCallum, David E, Ana Losada, Ryuji Kobayashi, et Tatsuya Hirano. 2002. « ISWI Remodeling Complexes in Xenopus Egg Extracts: Identification as Major Chromosomal Components That Are Regulated by INCENP-Aurora B ». *Molecular Biology of the Cell* 13 (1): 25-39. doi:10.1091/mbc.01-09-0441.

MacIver, Fiona H., Kayoko Tanaka, Alasdair M. Robertson, et Iain M. Hagan. 2003. « Physical and Functional Interactions between Polo Kinase and the Spindle Pole Component Cut12 Regulate Mitotic Commitment in *S. Pombe* ». *Genes & Development* 17 (12): 1507-1523. doi:10.1101/gad.256003.

Maeshima, Kazuhiro, Saera Hihara, et Mikhail Eltsov. 2010. « Chromatin Structure: Does the 30-Nm Fibre Exist in Vivo? ». *Current Opinion in Cell Biology* 22 (3): 291-297. doi:10.1016/j.ceb.2010.03.001.

Maeshima, Kazuhiro, Ryosuke Imai, Sachiko Tamura, et Tadasu Nozaki. 2014. « Chromatin as Dynamic 10-Nm Fibers ». *Chromosoma* 123 (3): 225-237. doi:10.1007/s00412-014-0460-2.

- Maeshima, Kazuhiro, et Ulrich K Laemmli. 2003. « A Two-Step Scaffolding Model for Mitotic Chromosome Assembly ». *Developmental Cell* 4 (4): 467-480.
- Manning, Amity L., Michelle S. Longworth, et Nicholas J. Dyson. 2010. « Loss of pRB Causes Centromere Dysfunction and Chromosomal Instability ». *Genes & Development* 24 (13): 1364-1376. doi:10.1101/gad.1917310.
- Marcus, G A, N Silverman, S L Berger, J Horiuchi, et L Guarente. 1994. « Functional Similarity and Physical Association between GCN5 and ADA2: Putative Transcriptional Adaptors ». *The EMBO Journal* 13 (20): 4807-4815.
- Marsden, M P, et U K Laemmli. 1979. « Metaphase Chromosome Structure: Evidence for a Radial Loop Model ». *Cell* 17 (4): 849-858.
- Martinez, E, T K Kundu, J Fu, et R G Roeder. 1998. « A Human SPT3-TAFII31-GCN5-L Acetylase Complex Distinct from Transcription Factor IID ». *The Journal of Biological Chemistry* 273 (37): 23781-23785.
- Matsuyama, Akihisa, Ritsuko Arai, Yoko Yashiroda, Atsuko Shirai, Ayako Kamata, Shigeo Sekido, Yumiko Kobayashi, et al. 2006. « ORFeome Cloning and Global Analysis of Protein Localization in the Fission Yeast *Schizosaccharomyces Pombe* ». *Nature Biotechnology* 24 (7): 841-847. doi:10.1038/nbt1222.
- Maudrell, K. 1990. « nmt1 of Fission Yeast. A Highly Transcribed Gene Completely Repressed by Thiamine ». *The Journal of Biological Chemistry* 265 (19): 10857-10864.
- . 1993. « Thiamine-Repressible Expression Vectors pREP and pRIP for Fission Yeast ». *Gene* 123 (1): 127-130.
- McIntosh, J R, et K L McDonald. 1989. « The Mitotic Spindle ». *Scientific American* 261 (4): 48-56.
- Mellone, Barbara G., Leslie Ball, Noriyuki Suka, Michael R. Grunstein, Janet F. Partridge, et Robin C. Allshire. 2003. « Centromere Silencing and Function in Fission Yeast Is Governed by the Amino Terminus of Histone H3 ». *Current Biology: CB* 13 (20): 1748-1757.
- Mendoza, Manuel, Caren Norden, Kathrin Durrer, Harald Rauter, Frank Uhlmann, et Yves Barral. 2009. « A Mechanism for Chromosome Segregation Sensing by the NoCut Checkpoint ». *Nature Cell Biology* 11 (4): 477-483. doi:10.1038/ncb1855.
- Mercer, Tim R., et John S. Mattick. 2013. « Structure and Function of Long Noncoding RNAs in Epigenetic Regulation ». *Nature Structural & Molecular Biology* 20 (3): 300-307.

doi:10.1038/nsmb.2480.

Mets, David G., et Barbara J. Meyer. 2009. « Condensins Regulate Meiotic DNA Break Distribution, Thus Crossover Frequency, by Controlling Chromosome Structure ». *Cell* 139 (1): 73-86. doi:10.1016/j.cell.2009.07.035.

Moazed, Danesh. 2009. « Small RNAs in Transcriptional Gene Silencing and Genome Defence ». *Nature* 457 (7228): 413-420. doi:10.1038/nature07756.

Monahan, Brendon J, Judit Villén, Samuel Marguerat, Jürg Bähler, Steven P Gygi, et Fred Winston. 2008. « Fission Yeast SWI/SNF and RSC Complexes Show Compositional and Functional Differences from Budding Yeast ». *Nature Structural & Molecular Biology* 15 (8): 873-880. doi:10.1038/nsmb.1452.

Mora-Bermúdez, Felipe, Daniel Gerlich, et Jan Ellenberg. 2007. « Maximal Chromosome Compaction Occurs by Axial Shortening in Anaphase and Depends on Aurora Kinase ». *Nature Cell Biology* 9 (7): 822-831. doi:10.1038/ncb1606.

Moreno, S., A. Klar, et P. Nurse. 1991. « Molecular Genetic Analysis of Fission Yeast *Schizosaccharomyces Pombe* ». *Methods in Enzymology* 194: 795-823.

Moyle-Heyrman, Georgette, Tetiana Zaichuk, Liqun Xi, Quanwei Zhang, Olke C. Uhlenbeck, Robert Holmgren, Jonathan Widom, et Ji-Ping Wang. 2013. « Chemical Map of *Schizosaccharomyces Pombe* Reveals Species-Specific Features in Nucleosome Positioning ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110 (50): 20158-20163. doi:10.1073/pnas.1315809110.

Murayama, Yasuto, et Frank Uhlmann. 2014. « Biochemical Reconstitution of Topological DNA Binding by the Cohesin Ring ». *Nature* 505 (7483): 367-371. doi:10.1038/nature12867.

Musacchio, Andrea, et Edward D Salmon. 2007. « The Spindle-Assembly Checkpoint in Space and Time ». *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 8 (5): 379-393. doi:10.1038/nrm2163.

Nabeshima, K, T Nakagawa, A F Straight, A Murray, Y Chikashige, Y M Yamashita, Y Hiraoka, et M Yanagida. 1998. « Dynamics of Centromeres during Metaphase-Anaphase Transition in Fission Yeast: Dis1 Is Implicated in Force Balance in Metaphase Bipolar Spindle ». *Molecular Biology of the Cell* 9 (11): 3211-3225.

Nagy, Z, et L Tora. 2007. « Distinct GCN5/PCAF-Containing Complexes Function as Co-Activators and Are Involved in Transcription Factor and Global Histone Acetylation ». *Oncogene* 26 (37): 5341-5357. doi:10.1038/sj.onc.1210604.

Nakamura, T, M Nakamura-Kubo, A Hirata, et C Shimoda. 2001. « The Schizosaccharomyces Pombe spo3+ Gene Is Required for Assembly of the Forespore Membrane and Genetically Interacts with psy1(+)-Encoding Syntaxin-like Protein ». *Molecular Biology of the Cell* 12 (12): 3955-3972.

Nakazawa, Norihiko, Rajesh Mehrotra, Masahiro Ebe, et Mitsuhiro Yanagida. 2011. « Condensin Phosphorylated by the Aurora-B-like Kinase Ark1 Is Continuously Required until Telophase in a Mode Distinct from Top2 ». *Journal of Cell Science* 124 (Pt 11): 1795-1807. doi:10.1242/jcs.078733.

Nakazawa, Norihiko, Takahiro Nakamura, Aya Kokubu, Masahiro Ebe, Koji Nagao, et Mitsuhiro Yanagida. 2008. « Dissection of the Essential Steps for Condensin Accumulation at Kinetochores and rDNAs during Fission Yeast Mitosis ». *The Journal of Cell Biology* 180 (6): 1115-1131. doi:10.1083/jcb.200708170.

Nasmyth, Kim. 2011. « Cohesin: A Catenase with Separate Entry and Exit Gates? » *Nature Cell Biology* 13 (10): 1170-1177. doi:10.1038/ncb2349.

Nicolas, Estelle, Takatomi Yamada, Hugh P Cam, Peter C Fitzgerald, Ryuji Kobayashi, et Shiv I S Grewal. 2007. « Distinct Roles of HDAC Complexes in Promoter Silencing, Antisense Suppression and DNA Damage Protection ». *Nature Structural & Molecular Biology* 14 (5): 372-380. doi:10.1038/nsmb1239.

Nishiyama, Tomoko, Rene Ladurner, Julia Schmitz, Emanuel Kreidl, Alexander Schleiffer, Venugopal Bhaskara, Masashige Bando, et al. 2010. « Sororin Mediates Sister Chromatid Cohesion by Antagonizing Wapl ». *Cell* 143 (5): 737-749. doi:10.1016/j.cell.2010.10.031.

Norden, Caren, Manuel Mendoza, Jeroen Dobbelaere, Chitra V Kotwaliwale, Sue Biggins, et Yves Barral. 2006. « The NoCut Pathway Links Completion of Cytokinesis to Spindle Midzone Function to Prevent Chromosome Breakage ». *Cell* 125 (1): 85-98. doi:10.1016/j.cell.2006.01.045.

Nugent, Rebecca L, Anna Johnsson, Brian Fleharty, Madelaine Gogol, Yongtao Xue-Franzén, Chris Seidel, Anthony Ph Wright, et Susan L Forsburg. 2010. « Expression Profiling of S. Pombe Acetyltransferase Mutants Identifies Redundant Pathways of Gene Regulation ». *BMC Genomics* 11: 59. doi:10.1186/1471-2164-11-59.

Nurse, P. 2000. « A Long Twentieth Century of the Cell Cycle and beyond ». *Cell* 100 (1): 71-78.

Ohta, Shinya, Jimi-Carlo Bukowski-Wills, Luis Sanchez-Pulido, Flavia de Lima Alves, Laura Wood, Zhuo A Chen, Melpi Platani, et al. 2010. « The Protein Composition of

Mitotic Chromosomes Determined Using Multiclassifier Combinatorial Proteomics ». *Cell* 142 (5): 810-821. doi:10.1016/j.cell.2010.07.047.

Olins, Donald E, et Ada L Olins. 2003. « Chromatin History: Our View from the Bridge ». *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 4 (10): 809-814. doi:10.1038/nrm1225.

Onn, Itay, Nobuki Aono, Michiko Hirano, et Tatsuya Hirano. 2007. « Reconstitution and subunit geometry of human condensin complexes ». *The EMBO Journal* 26 (4): 1024-1034. doi:10.1038/sj.emboj.7601562.

Ono, Takao, Yuda Fang, David L. Spector, et Tatsuya Hirano. 2004. « Spatial and Temporal Regulation of Condensins I and II in Mitotic Chromosome Assembly in Human Cells ». *Molecular Biology of the Cell* 15 (7): 3296-3308. doi:10.1091/mbc.E04-03-0242.

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): 109-121.

Orpinell, Meritxell, Marjorie Fournier, Anne Riss, Zita Nagy, Arnaud R Krebs, Mattia Frontini, et Làszlò Tora. 2010. « The ATAC Acetyl Transferase Complex Controls Mitotic Progression by Targeting Non-Histone Substrates ». *The EMBO Journal* 29 (14): 2381-2394. doi:10.1038/emboj.2010.125.

Over, Ryan S., et Scott D. Michaels. 2014. « Open and Closed: The Roles of Linker Histones in Plants and Animals ». *Molecular Plant* 7 (3): 481-491. doi:10.1093/mp/sst164.

Paolinelli, Roberta, Ramiro Mendoza-Maldonado, Anna Cereseto, et Mauro Giacca. 2009. « Acetylation by GCN5 Regulates CDC6 Phosphorylation in the S Phase of the Cell Cycle ». *Nature Structural & Molecular Biology* 16 (4): 412-420. doi:10.1038/nsmb.1583.

Parnell, Timothy J, Jason T Huff, et Bradley R Cairns. 2008. « RSC regulates nucleosome positioning at Pol II genes and density at Pol III genes ». *The EMBO Journal* 27 (1): 100-110. doi:10.1038/sj.emboj.7601946.

Pastré, David, Olivier Piétrement, Fabrice Landousy, Loïc Hamon, Isabelle Sorel, Marie-Odile David, Etienne Delain, Alain Zozime, et Eric Le Cam. 2006. « A New Approach to DNA Bending by Polyamines and Its Implication in DNA Condensation ». *European Biophysics Journal: EBJ* 35 (3): 214-223. doi:10.1007/s00249-005-0025-7.

Paull, Tanya T., et Rajashree A. Deshpande. 2014. « The Mre11/Rad50/Nbs1 complex: Recent insights into catalytic activities and ATP-driven conformational changes ». *Experimental Cell Research*. Consulté le juillet 23. doi:10.1016/j.yexcr.2014.07.007.

- Paweletz, Neidhard. 2001. « Walther Flemming: Pioneer of Mitosis Research ». *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2 (1): 72-75. doi:10.1038/35048077.
- Petrova, Boryana, Sascha Dehler, Tom Kruitwagen, Jean-Karim Hériché, Kota Miura, et Christian H Haering. 2013. « Quantitative Analysis of Chromosome Condensation in Fission Yeast ». *Molecular and Cellular Biology* 33 (5): 984-998. doi:10.1128/MCB.01400-12.
- Pferdehirt, Rebecca R., William S. Kruesi, et Barbara J. Meyer. 2011. « An MLL/COMPASS Subunit Functions in the C. Elegans Dosage Compensation Complex to Target X Chromosomes for Transcriptional Regulation of Gene Expression ». *Genes & Development* 25 (5): 499-515. doi:10.1101/gad.2016011.
- Piazza, Ilaria, Christian H Haering, et Anna Rutkowska. 2013. « Condensin: Crafting the Chromosome Landscape ». *Chromosoma* 122 (3): 175-190. doi:10.1007/s00412-013-0405-1.
- Piazza, Ilaria, Anna Rutkowska, Alessandro Ori, Marta Walczak, Jutta Metz, Vicent Pelechano, Martin Beck, et Christian H. Haering. 2014. « Association of Condensin with Chromosomes Depends on DNA Binding by Its HEAT-Repeat Subunits ». *Nature Structural & Molecular Biology* 21 (6): 560-568. doi:10.1038/nsmb.2831.
- Poirier, M., S. Eroglu, D. Chatenay, et J. F. Marko. 2000. « Reversible and Irreversible Unfolding of Mitotic Newt Chromosomes by Applied Force ». *Molecular Biology of the Cell* 11 (1): 269-276.
- Poirier, Michael G., et John F. Marko. 2002. « Mitotic Chromosomes Are Chromatin Networks without a Mechanically Contiguous Protein Scaffold ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99 (24): 15393-15397. doi:10.1073/pnas.232442599.
- Polo, Sophie E, et Geneviève Almouzni. 2006. « Chromatin assembly: a basic recipe with various flavours ». *Current Opinion in Genetics & Development* 16 (2): 104-111. doi:10.1016/j.gde.2006.02.011.
- Porter, Andrew C. G., et Christine J. Farr. 2004. « Topoisomerase II: Untangling Its Contribution at the Centromere ». *Chromosome Research: An International Journal on the Molecular, Supramolecular and Evolutionary Aspects of Chromosome Biology* 12 (6): 569-583. doi:10.1023/B:CHRO.0000036608.91085.d1.
- Probst, Aline V., Elaine Dunleavy, et Geneviève Almouzni. 2009. « Epigenetic Inheritance during the Cell Cycle ». *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 10 (3): 192-206. doi:10.1038/nrm2640.

Rawlings, Jason S., Martina Gatzka, Paul G. Thomas, et James N. Ihle. 2011. « Chromatin Condensation via the Condensin II Complex Is Required for Peripheral T-Cell Quiescence ». *The EMBO Journal* 30 (2): 263-276. doi:10.1038/emboj.2010.314.

Renshaw, Matthew J., Jonathan J. Ward, Masato Kanemaki, Kayo Natsume, François J. Nédélec, et Tomoyuki U. Tanaka. 2010. « Condensins Promote Chromosome Recoiling during Early Anaphase to Complete Sister Chromatid Separation ». *Developmental Cell* 19 (2): 232-244. doi:10.1016/j.devcel.2010.07.013.

Robellet, Xavier, Lydia Fauque, Pénélope Legros, Esther Mollereau, Stéphane Janczarski, Hugues Parrinello, Jean-Pierre Desvignes, Morgane Thevenin, et Pascal Bernard. 2014. « A Genetic Screen for Functional Partners of Condensin in Fission Yeast ». *G3 (Bethesda, Md.)* 4 (2): 373-381. doi:10.1534/g3.113.009621.

Robert, François, Dmitry K Pokholok, Nancy M Hannett, Nicola J Rinaldi, Mark Chandy, Alex Rolfe, Jerry L Workman, David K Gifford, et Richard A Young. 2004. « Global Position and Recruitment of HATs and HDACs in the Yeast Genome ». *Molecular Cell* 16 (2): 199-209. doi:10.1016/j.molcel.2004.09.021.

Rojas, J R, R C Trievel, J Zhou, Y Mo, X Li, S L Berger, C D Allis, et R Marmorstein. 1999. « Structure of Tetrahymena GCN5 Bound to Coenzyme A and a Histone H3 Peptide ». *Nature* 401 (6748): 93-98. doi:10.1038/43487.

Ryan, Colm J., Assen Roguev, Kristin Patrick, Jiewei Xu, Harlizawati Jahari, Zongtian Tong, Pedro Beltrao, et al. 2012. « Hierarchical Modularity and the Evolution of Genetic Interactomes across Species ». *Molecular Cell* 46 (5): 691-704. doi:10.1016/j.molcel.2012.05.028.

Saitoh, S, K Takahashi, et M Yanagida. 1997. « Mis6, a Fission Yeast Inner Centromere Protein, Acts during G1/S and Forms Specialized Chromatin Required for Equal Segregation ». *Cell* 90 (1): 131-143.

Saitoh, Y, et U K Laemmli. 1994. « Metaphase Chromosome Structure: Bands Arise from a Differential Folding Path of the Highly AT-Rich Scaffold ». *Cell* 76 (4): 609-622.

Saka, Y, T Sutani, Y Yamashita, S Saitoh, M Takeuchi, Y Nakaseko, et M 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): 4938-4952.

Samejima, I., T. Matsumoto, Y. Nakaseko, D. Beach, et M. Yanagida. 1993. « Identification of Seven New Cut Genes Involved in Schizosaccharomyces Pombe Mitosis ». *Journal of*

Cell Science 105 (Pt 1) (mai): 135-143.

Samejima, Kumiko, Itaru Samejima, Paola Vagnarelli, Hiromi Ogawa, Giulia Vargiu, David A. Kelly, Flavia de Lima Alves, et al. 2012. « Mitotic Chromosomes Are Compacted Laterally by KIF4 and Condensin and Axially by Topoisomerase II α ». *The Journal of Cell Biology* 199 (5): 755-770. doi:10.1083/jcb.201202155.

Sansó, Miriam, Itzel Vargas-Pérez, Luis Quintales, Francisco Antequera, José Ayté, et Elena Hidalgo. 2011. « Gcn5 Facilitates Pol II Progression, rather than Recruitment to Nucleosome-Depleted Stress Promoters, in *Schizosaccharomyces Pombe* ». *Nucleic Acids Research* 39 (15): 6369-6379. doi:10.1093/nar/gkr255.

Schmidt, Christine K., Neil Brookes, et Frank Uhlmann. 2009. « Conserved Features of Cohesin Binding along Fission Yeast Chromosomes ». *Genome Biology* 10 (5): R52. doi:10.1186/gb-2009-10-5-r52.

Shintomi, Keishi, et Tatsuya Hirano. 2011. « The Relative Ratio of Condensin I to II Determines Chromosome Shapes ». *Genes & Development* 25 (14): 1464-1469. doi:10.1101/gad.2060311.

Smith, Erica D., Yanfei Xu, Brett N. Tomson, Cindy G. Leung, Yuko Fujiwara, Stuart H. Orkin, et John D. Crispino. 2004. « More than Blood, a Novel Gene Required for Mammalian Postimplantation Development ». *Molecular and Cellular Biology* 24 (3): 1168-1173. doi:10.1128/MCB.24.3.1168-1173.2004.

Spåhr, Henrik, Jenny Bève, Thomas Larsson, Jörgen Bergström, Karl-Anders Karlsson, et Claes M. Gustafsson. 2000. « Purification and Characterization of RNA Polymerase II Holoenzyme from *Schizosaccharomyces Pombe* ». *Journal of Biological Chemistry* 275 (2): 1351-1356. doi:10.1074/jbc.275.2.1351.

Spedale, Gianpiero, H. Th Marc Timmers, et W. W. M. Pim Pijnappel. 2012. « ATAC-King the Complexity of SAGA during Evolution ». *Genes & Development* 26 (6): 527-541. doi:10.1101/gad.184705.111.

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): 416-426. doi:10.1016/j.molcel.2009.04.013.

Stear, Jeffrey H, et Mark B Roth. 2002. « Characterization of HCP-6, a *C. Elegans* Protein Required to Prevent Chromosome Twisting and Merotelic Attachment ». *Genes & Development* 16 (12): 1498-1508. doi:10.1101/gad.989102.

Stegmeier, Frank, et Angelika Amon. 2004. « Closing Mitosis: The Functions of the Cdc14 Phosphatase and Its Regulation ». *Annual Review of Genetics* 38: 203-232. doi:10.1146/annurev.genet.38.072902.093051.

Steigemann, Patrick, Claudia Wurzenberger, Michael H. A. Schmitz, Michael Held, Julien Guizetti, Sandra Maar, et Daniel W. Gerlich. 2009. « Aurora B-Mediated Abcission Checkpoint Protects against Tetraploidization ». *Cell* 136 (3): 473-484. doi:10.1016/j.cell.2008.12.020.

Stemmann, O, H Zou, S A Gerber, S P Gygi, et M W Kirschner. 2001. « Dual Inhibition of Sister Chromatid Separation at Metaphase ». *Cell* 107 (6): 715-726.

Sterner, D E, P A Grant, S M Roberts, L J Duggan, R Belotserkovskaya, L A Pacella, F Winston, J L Workman, et S L Berger. 1999. « Functional Organization of the Yeast SAGA Complex: Distinct Components Involved in Structural Integrity, Nucleosome Acetylation, and TATA-Binding Protein Interaction ». *Molecular and Cellular Biology* 19 (1): 86-98.

Sterner, David E, Xun Wang, Melissa H Bloom, Gabriel M Simon, et Shelley L Berger. 2002. « The SANT Domain of Ada2 Is Required for Normal Acetylation of Histones by the Yeast SAGA Complex ». *The Journal of Biological Chemistry* 277 (10): 8178-8186. doi:10.1074/jbc.M108601200.

Strukov, Yuri G, Tûba H Sural, Mitzi I Kuroda, et John W Sedat. 2011. « Evidence of Activity-Specific, Radial Organization of Mitotic Chromosomes in Drosophila ». *PLoS Biology* 9 (1): e1000574. doi:10.1371/journal.pbio.1000574.

Sudarsanam, P., V. R. Iyer, P. O. Brown, et F. Winston. 2000. « Whole-Genome Expression Analysis of Snf/swi Mutants of Saccharomyces Cerevisiae ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97 (7): 3364-3369. doi:10.1073/pnas.050407197.

Sutani, Takashi, Tatsuro Yuasa, Takeshi Tomonaga, Naoshi Dohmae, Koji Takio, et Mitsuhiro Yanagida. 1999. « Fission Yeast Condensin Complex: Essential Roles of Non-SMC Subunits for Condensation and Cdc2 Phosphorylation of Cut3/SMC4 ». *Genes & Development* 13 (17): 2271-2283.

Szerlong, Heather, Anjanabha Saha, et Bradley R. Cairns. 2003. « The Nuclear Actin-Related Proteins Arp7 and Arp9: A Dimeric Module That Cooperates with Architectural Proteins for Chromatin Remodeling ». *The EMBO Journal* 22 (12): 3175-3187. doi:10.1093/emboj/cdg296.

- Tada, Kenji, Hiroaki Susumu, Takeshi Sakuno, et Yoshinori Watanabe. 2011. « Condensin Association with Histone H2A Shapes Mitotic Chromosomes ». *Nature* 474 (7352): 477-483. doi:10.1038/nature10179.
- 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): 5339-5348. doi:10.1038/sj.emboj.7601394.
- Takemoto, Ai, Kazuhiro Maeshima, Tsuyoshi Ikehara, Kazumitsu Yamaguchi, Akiko Murayama, Shihoko Imamura, Naoko Imamoto, et al. 2009. « The Chromosomal Association of Condensin II Is Regulated by a Noncatalytic Function of PP2A ». *Nature Structural & Molecular Biology* 16 (12): 1302-1308. doi:10.1038/nsmb.1708.
- Takemoto, Ai, Akiko Murayama, Miyuki Katano, Takeshi Urano, Koichi Furukawa, Shigeyuki Yokoyama, Junn Yanagisawa, Fumio Hanaoka, et Keiji Kimura. 2007. « Analysis of the Role of Aurora B on the Chromosomal Targeting of Condensin I ». *Nucleic Acids Research* 35 (7): 2403-2412. doi:10.1093/nar/gkm157.
- Tanaka, Atsunari, Hideki Tanizawa, Sira Sriswasdi, Osamu Iwasaki, Atreyi G. Chatterjee, David W. Speicher, Henry L. Levin, Eishi Noguchi, et Ken-Ichi Noma. 2012. « Epigenetic Regulation of Condensin-Mediated Genome Organization during the Cell Cycle and upon DNA Damage through Histone H3 Lysine 56 Acetylation ». *Molecular Cell* 48 (4): 532-546. doi:10.1016/j.molcel.2012.09.011.
- Tanaka, Koichi, Toshihiro Yonekawa, Yosuke Kawasaki, Mihoko Kai, Kanji Furuya, Masaomi Iwasaki, Hiroshi Murakami, Mitsuhiro Yanagida, et Hiroto Okayama. 2000. « Fission Yeast Eso1p Is Required for Establishing Sister Chromatid Cohesion during S Phase ». *Molecular and Cellular Biology* 20 (10): 3459.
- Tatebayashi, K., J. Kato, et H. Ikeda. 1998. « Isolation of a *Schizosaccharomyces Pombe* rad21ts Mutant That Is Aberrant in Chromosome Segregation, Microtubule Function, DNA Repair and Sensitive to Hydroxyurea: Possible Involvement of Rad21 in Ubiquitin-Mediated Proteolysis ». *Genetics* 148 (1): 49-57.
- Taylor, J. H. 1960. « Nucleic Acid Synthesis in Relation to the Cell Division Cycle ». *Annals of the New York Academy of Sciences* 90 (octobre): 409-421.
- Tedeschi, Antonio, Gordana Wutz, Sébastien Huet, Markus Jaritz, Annelie Wuensche, Erika Schirghuber, Iain Finley Davidson, et al. 2013. « Wapl Is an Essential Regulator of Chromatin Structure and Chromosome Segregation ». *Nature* 501 (7468): 564-568.

doi:10.1038/nature12471.

Terrenoire, Edith, Fiona McDonald, John A Halsall, Paula Page, Robert S Illingworth, A Malcolm R Taylor, Val Davison, Laura P O'Neill, et Bryan M Turner. 2010. « Immunostaining of Modified Histones Defines High-Level Features of the Human Metaphase Epigenome ». *Genome Biology* 11 (11): R110. doi:10.1186/gb-2010-11-11-r110.

Thoma, F, T Koller, et A Klug. 1979. « Involvement of Histone H1 in the Organization of the Nucleosome and of the Salt-Dependent Superstructures of Chromatin ». *The Journal of Cell Biology* 83 (2 Pt 1): 403-427.

Tsang, Chi Kwan, Hong Li, et XF Steven Zheng. 2007. « Nutrient Starvation Promotes Condensin Loading to Maintain rDNA Stability ». *The EMBO Journal* 26 (2): 448-458. doi:10.1038/sj.emboj.7601488.

Uemura, T, H Ohkura, Y Adachi, K Morino, K Shiozaki, et M Yanagida. 1987. « DNA Topoisomerase II Is Required for Condensation and Separation of Mitotic Chromosomes in *S. Pombe* ». *Cell* 50 (6): 917-925.

Ushiki, Tatsuo, Osamu Hoshi, Kousuke Iwai, Eiji Kimura, et Masatsugu Shigeno. 2002. « The Structure of Human Metaphase Chromosomes: Its Histological Perspective and New Horizons by Atomic Force Microscopy ». *Archives of Histology and Cytology* 65 (5): 377-390.

Vagnarelli, Paola. 2012. « Mitotic Chromosome Condensation in Vertebrates ». *Experimental Cell Research* 318 (12): 1435-1441. doi:10.1016/j.yexcr.2012.03.017.

Vagnarelli, Paola, Damien F. Hudson, Susana A. Ribeiro, Laura Trinkle-Mulcahy, Jennifer M. Spence, Fan Lai, Christine J. Farr, Angus I. Lamond, et William C. Earnshaw. 2006. « Condensin and Repo-Man-PP1 co-operate in the regulation of chromosome architecture during mitosis ». *Nature Cell Biology* 8 (10): 1133-1142. doi:10.1038/ncb1475.

Valls, Ester, Sara Sánchez-Molina, et Marian A. Martínez-Balbás. 2005. « Role of Histone Modifications in Marking and Activating Genes through Mitosis ». *The Journal of Biological Chemistry* 280 (52): 42592-42600. doi:10.1074/jbc.M507407200.

Vanoosthuyse, Vincent, Pénélope Legros, Sjaak J. A. van der Sar, Gaël Yvert, Kenji Toda, Thierry Le Bihan, Yoshinori Watanabe, Kevin Hardwick, et Pascal Bernard. 2014. « CPF-Associated Phosphatase Activity Opposes Condensin-Mediated Chromosome Condensation ». *PLoS Genetics* 10 (6): e1004415. doi:10.1371/journal.pgen.1004415.

- Varela, Elisa, Kenji Shimada, Thierry Laroche, Didier Leroy, et Susan M. Gasser. 2009. « Lte1, Cdc14 and MEN-Controlled Cdk Inactivation in Yeast Coordinate rDNA Decompaction with Late Telophase Progression ». *The EMBO Journal* 28 (11): 1562-1575. doi:10.1038/emboj.2009.111.
- Verdel, André, Aurélia Vavasseur, Madalen Le Gorrec, et Leila Touat-Todeschini. 2009. « Common Themes in siRNA-Mediated Epigenetic Silencing Pathways ». *The International Journal of Developmental Biology* 53 (2-3): 245-257. doi:10.1387/ijdb.082691av.
- Vermeulen, Michiel, H Christian Eberl, Filomena Matarese, Hendrik Marks, Sergei Denissov, Falk Butter, Kenneth K Lee, et al. 2010. « Quantitative Interaction Proteomics and Genome-Wide Profiling of Epigenetic Histone Marks and Their Readers ». *Cell* 142 (6): 967-980. doi:10.1016/j.cell.2010.08.020.
- Vernarecci, Stefano, Prisca Ornaghi, Anacristina Bâgu, Enrico Cundari, Paola Ballario, et Patrizia Filetici. 2008. « Gcn5p Plays an Important Role in Centromere Kinetochore Function in Budding Yeast ». *Molecular and Cellular Biology* 28 (3): 988-996. doi:10.1128/MCB.01366-07.
- Vetting, Matthew W., Luiz Pedro S. de Carvalho, Michael Yu, Subray S. Hegde, Sophie Magnet, Steven L. Roderick, et John S. Blanchard. 2005. « Structure and functions of the GNAT superfamily of acetyltransferases ». *Archives of Biochemistry and Biophysics*, Highlight issue on Enzyme Mechanisms, 433 (1): 212-226. doi:10.1016/j.abb.2004.09.003.
- Vielle, Anne, Jackie Lang, Yan Dong, Sevinc Ercan, Chitra Kotwaliwale, Andreas Rechtsteiner, Alex Appert, et al. 2012. « H4K20me1 Contributes to Downregulation of X-Linked Genes for C. Elegans Dosage Compensation ». *PLoS Genetics* 8 (9): e1002933. doi:10.1371/journal.pgen.1002933.
- Visvanathan, Ashwat, Kashif Ahmed, Liron Even-Faitelson, David Lleres, David P. Bazett-Jones, et Angus I. Lamond. 2013. « Modulation of Higher Order Chromatin Conformation in Mammalian Cell Nuclei Can Be Mediated by Polyamines and Divalent Cations ». Édité par Heidar-Ali Tajmir-Riahi. *PLoS ONE* 8 (6): e67689. doi:10.1371/journal.pone.0067689.
- Wallace, Heather M., Alison V. Fraser, et Alun Hughes. 2003. « A perspective of polyamine metabolism ». *Biochemical Journal* 376 (1): 1. doi:10.1042/BJ20031327.

- Wang, Fangwei, et Jonathan M G Higgins. 2013. « Histone Modifications and Mitosis: Countermarks, Landmarks, and Bookmarks ». *Trends in Cell Biology* 23 (4): 175-184. doi:10.1016/j.tcb.2012.11.005.
- Wang, Shao-Win, Kazuhide Asakawa, Thein Z. Win, Takashi Toda, et Chris J. Norbury. 2005. « Inactivation of the Pre-mRNA Cleavage and Polyadenylation Factor Pfs2 in Fission Yeast Causes Lethal Cell Cycle Defects ». *Molecular and Cellular Biology* 25 (6): 2288-2296. doi:10.1128/MCB.25.6.2288-2296.2005.
- Weake, Vikki M, et Jerry L Workman. 2012. « SAGA Function in Tissue-Specific Gene Expression ». *Trends in Cell Biology* 22 (4): 177-184. doi:10.1016/j.tcb.2011.11.005.
- Weiss, Eric L. 2012. « Mitotic Exit and Separation of Mother and Daughter Cells ». *Genetics* 192 (4): 1165-1202. doi:10.1534/genetics.112.145516.
- Whyte, Warren A., David A. Orlando, Denes Hnisz, Brian J. Abraham, Charles Y. Lin, Michael H. Kagey, Peter B. Rahl, Tong Ihn Lee, et Richard A. Young. 2013. « Master Transcription Factors and Mediator Establish Super-Enhancers at Key Cell Identity Genes ». *Cell* 153 (2): 307-319. doi:10.1016/j.cell.2013.03.035.
- Wieczorek, E, M Brand, X Jacq, et L Tora. 1998. « Function of TAF(II)-Containing Complex without TBP in Transcription by RNA Polymerase II ». *Nature* 393 (6681): 187-191. doi:10.1038/30283.
- Wilkins, Bryan J., Nils A. Rall, Yogesh Ostwal, Tom Kruitwagen, Kyoko Hiragami-Hamada, Marco Winkler, Yves Barral, Wolfgang Fischle, et Heinz Neumann. 2014. « A Cascade of Histone Modifications Induces Chromatin Condensation in Mitosis ». *Science (New York, N.Y.)* 343 (6166): 77-80. doi:10.1126/science.1244508.
- Wirén, Marianna, Rebecca A Silverstein, Indranil Sinha, Julian Walfridsson, Hang-Mao Lee, Patricia Laurensen, Lorraine Pillus, Daniel Robyr, Michael Grunstein, et Karl Ekwall. 2005. « Genomewide Analysis of Nucleosome Density Histone Acetylation and HDAC Function in Fission Yeast ». *The EMBO Journal* 24 (16): 2906-2918. doi:10.1038/sj.emboj.7600758.
- Woo, Jae-Sung, Jae-Hong Lim, Ho-Chul Shin, Min-Kang Suh, Bonsu Ku, Kwang-Hoon Lee, Keehyoung Joo, et al. 2009. « Structural Studies of a Bacterial Condensin Complex Reveal ATP-Dependent Disruption of Intersubunit Interactions ». *Cell* 136 (1): 85-96. doi:10.1016/j.cell.2008.10.050.
- Wood, Andrew J., Aaron F. Severson, et Barbara J. Meyer. 2010. « Condensin and Cohesin

- Complexity: The Expanding Repertoire of Functions ». *Nature Reviews. Genetics* 11 (6): 391-404. doi:10.1038/nrg2794.
- Wood, Valerie, Midori A Harris, Mark D McDowall, Kim Rutherford, Brendan W Vaughan, Daniel M Staines, Martin Aslett, et al. 2012. « PomBase: A Comprehensive Online Resource for Fission Yeast ». *Nucleic Acids Research* 40 (Database issue): D695-699. doi:10.1093/nar/gkr853.
- Woods, A., T. Sherwin, R. Sasse, T. H. MacRae, A. J. Baines, et K. Gull. 1989. « Definition of Individual Components within the Cytoskeleton of Trypanosoma Brucei by a Library of Monoclonal Antibodies ». *Journal of Cell Science* 93 (Pt 3) (juillet): 491-500.
- Wu, Nan, et Hongtao Yu. 2012. « The Smc Complexes in DNA Damage Response ». *Cell & Bioscience* 2: 5. doi:10.1186/2045-3701-2-5.
- Xhemalce, Blerta, et Tony Kouzarides. 2010. « A Chromodomain Switch Mediated by Histone H3 Lys 4 Acetylation Regulates Heterochromatin Assembly ». *Genes & Development* 24 (7): 647-652. doi:10.1101/gad.1881710.
- Xing, Hongyan, Nathan L. Vanderford, et Kevin D. Sarge. 2008. « The TBP-PP2A Mitotic Complex Bookmarks Genes by Preventing Condensin Action ». *Nature Cell Biology* 10 (11): 1318-1323. doi:10.1038/ncb1790.
- Xu, Wanting, Diane G. Edmondson, et Sharon Y. Roth. 1998. « Mammalian GCN5 and P/CAF Acetyltransferases Have Homologous Amino-Terminal Domains Important for Recognition of Nucleosomal Substrates ». *Molecular and Cellular Biology* 18 (10): 5659-5669.
- Xu, Y., C. G. Leung, D. C. Lee, B. K. Kennedy, et J. D. Crispino. 2006. « MTB, the Murine Homolog of Condensin II Subunit CAP-G2, Represses Transcription and Promotes Erythroid Cell Differentiation ». *Leukemia* 20 (7): 1261-1269. doi:10.1038/sj.leu.2404252.
- Yen, Kuangyu, Vinesh Vinayachandran, Kiran Batta, R. Thomas Koerber, et B. Franklin Pugh. 2012. « Genome-wide Nucleosome Specificity and Directionality of Chromatin Remodelers ». *Cell* 149 (7): 1461-1473. doi:10.1016/j.cell.2012.04.036.
- Yeong, Foong May, Hans Hombauer, Kerstin S. Wendt, Toru Hirota, Ingrid Mudrak, Karl Mechtler, Thomas Loregger, et al. 2003. « Identification of a Subunit of a Novel Kleisin- β /SMC Complex as a Potential Substrate of Protein Phosphatase 2A ». *Current Biology* 13 (23): 2058-2064. doi:10.1016/j.cub.2003.10.032.
- Yokobayashi, Shihori, et Yoshinori Watanabe. 2005. « The Kinetochore Protein Moa1

Enables Cohesion-Mediated Monopolar Attachment at Meiosis I ». *Cell* 123 (5): 803-817. doi:10.1016/j.cell.2005.09.013.

Yu, Hong-Guo, et Douglas E. Koshland. 2003. « Meiotic Condensin Is Required for Proper Chromosome Compaction, SC Assembly, and Resolution of Recombination-Dependent Chromosome Linkages ». *The Journal of Cell Biology* 163 (5): 937-947. doi:10.1083/jcb.200308027.

Zeng, Lei, et Ming Ming Zhou. 2002. « Bromodomain: An Acetyl-Lysine Binding Domain ». *FEBS Letters* 513 (1): 124-128.

Zentner, Gabriel E, et Steven Henikoff. 2013. « Regulation of Nucleosome Dynamics by Histone Modifications ». *Nature Structural & Molecular Biology* 20 (3): 259-266. doi:10.1038/nsmb.2470.

Zhao, Yue, Guillaume Lang, Saya Ito, Jacques Bonnet, Eric Metzger, Shun Sawatsubashi, Eriko Suzuki, et al. 2008. « A TFTC/STAGA Module Mediates Histone H2A and H2B Deubiquitination, Coactivates Nuclear Receptors, and Counteracts Heterochromatin Silencing ». *Molecular Cell* 29 (1): 92-101. doi:10.1016/j.molcel.2007.12.011.

Zhou, Wenlai, Ping Zhu, Jianxun Wang, Gabriel Pascual, Kenneth A. Ohgi, Jean Lozach, Christopher K. Glass, et Michael G. Rosenfeld. 2008. « Histone H2A Monoubiquitination Represses Transcription by Inhibiting RNA Polymerase II Transcriptional Elongation ». *Molecular Cell* 29 (1): 69-80. doi:10.1016/j.molcel.2007.11.002.

Annexe

Publication en co-1e auteur, dans le journal G: Genes/ Genomes/Genetics.

A Genetic Screen for Functional Partners of Condensin in Fission Yeast

[Xavier Robellet*](#)^{1,2}, [Lydia Fauque*](#)¹, [Pénélope Legros*](#), [Esther Mollereau*](#),

[Stéphane Janczarski*](#), [Hugues Parrinello†](#), [Jean-Pierre Desvignes†](#)³,

[Morgane Thevenin*](#) and [Pascal Bernard*](#)⁴

± Author Affiliations

1. ^{*}*LBMC, CNRS UMR 5239, Ecole Normale Supérieure de Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1, Lyon, France, F-69364*
2. [†]*MGX-Montpellier GenomiX, Institut de Genomique Fonctionnelle, Montpellier, France, F-34094*

± Author Notes

- [↵2](#) Present address: IRIC, Université de Montréal. Montréal, H3C 3J7, Canada.
 - [↵3](#) Present address: U910 INSERM; Faculté de Médecine secteur Timone, Marseille, France.
1. [↵4](#)Corresponding author: Laboratoire de Biologie Moléculaire de la Cellule, CNRS UMR5239/ENS Lyon/UCBL, Ecole normale supérieure de Lyon, 46, allée d'Italie, 69364 Lyon cedex 07, France. E-mail: pascal.bernard@ens-lyon.fr
 1. [↵1](#) These authors contributed equally to this work.

A Genetic Screen for Functional Partners of Condensin in Fission Yeast

Xavier Robellet,^{*,1,2} Lydia Fauque,^{*,1} Pénélope Legros,^{*} Esther Mollereau,^{*} Stéphane Janczarski,^{*} Hugues Parrinello,[†] Jean-Pierre Desvignes,^{†,3} Morgane Thevenin,^{*} and Pascal Bernard^{*,4}

^{*}LBMC, CNRS UMR 5239, Ecole Normale Supérieure de Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1, Lyon, France, F-69364, and [†]MGX-Montpellier GenomiX, Institut de Genomique Fonctionnelle, Montpellier, France, F-34094

ABSTRACT Mitotic chromosome condensation is a prerequisite for the accurate segregation of chromosomes during cell division, and the conserved condensin complex a central player of this process. However, how condensin binds chromatin and shapes mitotic chromosomes remain poorly understood. Recent genome-wide binding studies showing that in most species condensin is enriched near highly expressed genes suggest a conserved link between condensin occupancy and high transcription rates. To gain insight into the mechanisms of condensin binding and mitotic chromosome condensation, we searched for factors that collaborate with condensin through a synthetic lethal genetic screen in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. We isolated novel mutations affecting condensin, as well as mutations in four genes not previously implicated in mitotic chromosome condensation in fission yeast. These mutations cause chromosome segregation defects similar to those provoked by defects in condensation. We also identified a suppressor of the *cut3-477* condensin mutation, which largely rescued chromosome segregation during anaphase. Remarkably, of the five genes identified in this study, four encode transcription co-factors. Our results therefore provide strong additional evidence for a functional connection between chromosome condensation and transcription.

KEYWORDS

condensin
fission yeast
synthetic lethality
mitotic
chromosome
condensation

Mitotic entry is characterized by the reorganization of long and entangled chromatin fibers into individualized, compact and rod-shaped mitotic chromosomes. This large-scale reorganization, called mitotic chromosome condensation, is essential for accurate chromosome segregation and is thought to serve at least two essential purposes: the removal of interchromosomal and interchromatids DNA catenations and the shortening of chromosome arms so that sister DNA molecules

efficiently separate during anaphase. Although first described more than a century ago, the molecular mechanisms underlying mitotic chromosome condensation remain elusive.

From yeasts to human, mitotic chromosome condensation relies on two chromosomal components named topoisomerase II (topo II) and condensin (Baxter and Aragon 2012; Hirano 2012; Piazza *et al.* 2013). Condensin and/or topo II deficiency alters the structural integrity of chromosomes, leading to a failure to separate chromosomes arms and to the formation of chromatin bridges in anaphase. Although clear evidence now exists that condensin collaborates with topo II to remove catenations between chromatids (Baxter *et al.* 2011), how condensin associates with chromatin and, in this context, shapes mitotic chromosomes in a cell cycle-regulated manner remains poorly understood.

Condensin is a proteinaceous ring composed of two Smc ATPases, Cut3/Smc4/CAP-C and Cut14/Smc2/CAP-E, associated with three non-SMC auxiliary subunits (Hirano 2012; Piazza *et al.* 2013). Smc2 and Smc4 interact through their hinge domains, forming a V-shaped heterodimer with the two ATPase domains facing each other at the apices of two 50-nm-long coiled coil arms. The kleisin subunit Cnd2/Barren/CAP-H bridges the Smc2/Smc4 ATPase heads and recruits two additional subunits.

Copyright © 2014 Robellet *et al.*

doi: 10.1534/g3.113.009621

Manuscript received October 8, 2013; accepted for publication December 16, 2013; published Early Online December 20, 2013.

This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Unported License (<http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Supporting information is available online at <http://www.g3journal.org/lookup/suppl/doi:10.1534/g3.113.009621/-/DC1>

¹These authors contributed equally to this work.

²Present address: IRIC, Université de Montréal, Montréal, H3C 3J7, Canada.

³Present address: U910 INSERM; Faculté de Médecine secteur Timone, Marseille, France.

⁴Corresponding author: Laboratoire de Biologie Moléculaire de la Cellule, CNRS UMR5239/ENS Lyon/UCBL, Ecole normale supérieure de Lyon, 46, allée d'Italie, 69364 Lyon cedex 07, France. E-mail: pascal.bernard@ens-lyon.fr

Condensin belongs to the family of structural maintenance of chromosomes (SMC) complexes, which includes the cohesin ring that mediates sister-chromatid cohesion. Like cohesin, condensin binds to chromosomes by encircling DNA, and this topological association appears important for chromosome condensation (Cuylen *et al.* 2011). On the basis of these observations, a structural model has been proposed whereby the role of condensin in chromosome condensation is to create and/or stabilize chromatin loops by encircling one or two chromatin fibers (Losada and Hirano 2005; Cuylen and Haering 2011). However, in human cells, ~80% of condensin I (the human counterpart of yeasts condensin) exchanges dynamically from mitotic chromosomes in early mitosis whereas the remaining ~20% are more stably bound (Gerlich *et al.* 2006), which suggests that at least two modes of interaction with chromatin may coexist and that condensin may drive chromosome condensation through a more dynamic and perhaps more complex mechanism. In line with this, condensin possesses an ATP-dependent DNA supercoiling activity stimulated by phosphorylation by the mitotic kinases cyclin-dependent kinase (CDK)1/Cdc2 and Polo (Kimura *et al.* 1998; St-Pierre *et al.* 2009; Piazza *et al.* 2013) and capable of driving decatenation by topo II during mitosis *in vivo* (Baxter *et al.* 2011). An enzymatic model proposes that condensin-mediated positive supercoiling of DNA is the driving force of mitotic chromosome condensation (Baxter and Aragon 2012). The different dynamics exhibited by chromosomal condensin complexes may reflect the coexistence of both an enzymatic and a more structural role.

With the notable exception of budding and fission yeasts, most eukaryotic species possess a second condensin complex, called condensin II, that differs from the canonical condensin (also known as condensin I) by a distinct set of three auxiliary, non-SMC proteins (Hirano 2012). Condensin I and II do not colocalize along the longitudinal axes of sister-chromatids, differ in the spatiotemporal regulation of their localizations, in their dynamics of chromatin association (condensin II being more stably bound), and in their respective contribution to mitotic chromosome formation (Hirano 2012). Thus, non-SMC subunits must play a key role in determining where, when, and how condensins associate with chromatin. However, the underlying mechanisms remain poorly understood.

Chromatin environment can also influence the association and/or activity of condensin complexes (Xing *et al.* 2008; Tanaka *et al.* 2012). Human condensin II binds monomethylated H4-K20 and tends to colocalize with this mark on chromosomes (Liu *et al.* 2010). Both human condensin I and fission yeast condensin bind histone H2A or its variant H2A.Z, and these interactions are stimulated by the phosphorylation of the kleisin Cnd2/Barren/CAP-H by Aurora-B kinase (Tada *et al.* 2011). Although condensin associates with nucleosomes, its distribution along chromosomes is not homogenous. Genome-wide binding studies in yeasts and chicken DT40 cells have shown that yeast condensin and vertebrate condensin I are enriched at centromeres and near highly expressed genes along chromosome arms (D'Ambrosio *et al.* 2008; Kim *et al.* 2013). Condensin binding near transfer RNA genes and at the 35S ribosomal DNA (rDNA) relies on the transcription factors TFIIC and Acr1, respectively (D'Ambrosio *et al.* 2008; Nakazawa *et al.* 2008; Tada *et al.* 2011). Furthermore, a physical interaction has been described between condensin and TFIIC in budding and fission yeasts (Haeusler *et al.* 2008; Iwasaki *et al.* 2010). Yet, transcription has been shown to preclude condensin binding (Clemente-Blanco *et al.* 2009, 2011), and condensin accumulates on chromatin during mitosis, when transcription is generally down-regulated. The biological significance of this apparent paradox is not yet known.

Potentially adding further complexity to the picture are reports that depletion of Smc4 or Smc2 delays, but does not prevent, the formation of compacted metaphase chromosomes in *Caenorhabditis elegans*, chicken, and human cells (Hudson *et al.* 2009). However, those condensin-depleted chromosomes lack structural integrity and form extensive chromatin bridges during anaphase. These observations led to the proposal that condensin's primary function is to preserve the structural integrity of the mitotic chromosome during anaphase while an as-yet-identified activity called regulator of chromosome architecture (RCA) ensures the initial compaction of chromatin when CDK activity is high (Vagnarelli *et al.* 2006). However, the finding that 5% of the wild-type level of Smc2 persist in Smc2-depleted chicken DT40 cells (Ohta *et al.* 2010) raises the alternative possibility that traces of condensin suffice to drive condensation from prophase to metaphase but not for providing the stiffness required for chromosome segregation upon anaphase onset.

Regardless of the exact mechanisms, condensin most likely functions with multiple cofactors to associate with chromatin and to ensure its reorganization in a cell cycle-regulated manner. To gain insights into the mechanisms of condensin binding and mitotic chromosome condensation, we searched for factors that collaborate with condensin through an unbiased genetic screen in fission yeast. Using a tester strain bearing a thermosensitive allele of the Cut3/Smc4 ATPase (Saka *et al.* 1994), we isolated mutations resulting in synthetic lethality at the permissive temperature. As expected, our screen resulted in the identification of mutations in other condensin subunits. In addition, we identified a class of mutations affecting chromatin modifiers linked to transcription, consistent with a close functional interplay between condensin and the transcription machinery.

MATERIALS AND METHODS

Media, molecular genetics, and strains

Media and molecular genetics methods were as described previously (Moreno *et al.* 1991). Complete medium was YES+A. The synthetic medium was PMG unless otherwise stated. Gene deletions were performed using a polymerase chain reaction (PCR)-based method, as described (Bahler *et al.* 1998). All deletions were confirmed by PCR. Strains used in this study are listed in Supporting Information, Table S1.

Construction of the tester strain *nmt41-cut3 cut3-477*

The *cut3* open reading frame was PCR-amplified from genomic DNA using Pfu ultra DNA polymerase with primers GTTGTTCGCGAACA CACCTCTTTTCACGAC and TATACCGCGGCTTTGCGCAGAT TTTACAG, digested with *NruI* and *SacII* (sites are underlined in primer sequences), and cloned into the replicative expression vector pJR2-41XL (Moreno *et al.* 2000). The recombinant plasmid, pREP41-cut3, was linearized by cutting within *ars1* with *MluI* and inserted into the genome of a thermosensitive *cut3-477* mutant strain, presumably at the *ars1* locus. A stable transformant that exhibited thiamine-dependent thermosensitivity for growth at 36° was selected and backcrossed to give rise to the tester strain *nmt41-cut3 cut3-477*. The genes *cut3-477* and *nmt41-cut3* segregated independently of each other in crosses.

Mutagenesis and screening

The tester strain was mutagenized with ethylmethane sulfonate 2% (w/v) during one generation at 32° in EMM2 synthetic medium without thiamine, as described (Moreno *et al.* 1991). Mutagenized cells were plated on PMG medium without thiamine at 32°, and colonies

were replicated onto PMG plus phloxine B without or with (20 μ M) thiamine. Colonies that stained dark red onto PMG phloxine B plus thiamine at 32° were selected.

Reverse Transcriptase (RT)-quantitative (q)PCR

Total RNA was extracted from 10⁸ cells by standard hot-phenol method. Reverse transcription was performed on 500 ng of total RNA using Superscript II (Invitrogen) and random hexamers. RT-qPCR analyses were performed with a Rotor-Gene PCR cyclor.

Genetic mapping

Genetic mapping was performed as described (Anders *et al.* 2008). Mutations were assigned to a given chromosome through homozygous *rec12Δ* crosses. Subchromosomal mapping, when necessary, was performed using *swi5Δ*.

Immunofluorescence

Immunofluorescence was performed as described previously (Bernard *et al.* 2010) with the use of anti- α tubulin Tat1 antibody (Woods *et al.* 1989). Spindle length was measured with Image J software.

Chromatin immunoprecipitation (ChIP)

Cells arrested in prometaphase at 17° were fixed with 1% formaldehyde for 30 min and processed for chromatin immunoprecipitation as described (Bernard *et al.* 2010) using the anti-GFP antibody A11122. Immune complexes were collected with Dynabeads protein A. Real time-qPCR analyses were performed using Rotor-Gene PCR cyclor. Primers sequences are available upon request.

Sequencing

Next-generation sequencing was performed by using Illumina HiSeq 2000. A total of 20 μ g of genomic DNA was prepared from the mutant strains *slc129*, *slc174*, *slc185*, or *sup122*, sonicated using BioRuptor for 35 min at 320W (30 sec ON, 30 sec OFF) and processed using the TruSeq DNA Sample Prep Kit (Illumina). DNA samples were sequenced with a coverage varying between 180 and 230X and aligned to the *S. pombe* reference genome using the CASAVA 1.8 software. Single-nucleotide polymorphisms (SNPs) and single-nucleotide insertions or deletions were sought using CASAVA 1.8. Mutations of interest were confirmed by PCR amplification of candidate gene using Phusion DNA polymerase and Sanger sequencing of the PCR product.

RESULTS

The condensin mutant *cut3-477* is defective for chromosome condensation at 32°

To identify factors that collaborate with condensin, we performed a genetic screen for mutants unable to survive when condensin is partly deficient. We chose the thermosensitive *cut3-477* mutation to weaken condensin because this mutation in the Cut3/Smc4 ATPase has been shown to cause synthetic lethality when combined with *top2-250* at the permissive temperature of 30° (Saka *et al.* 1994), suggesting that *cut3-477* mutant cells survive with a partly defective condensin complex. In agreement, we observed chromatin bridges and chromatin masses trailing on the mitotic spindle in *cut3-477* mutant cells cultured at 25°, 32° and 37° (Figure S1A). Growth of the *cut3-477* mutant strain at 32° (see Figure 1B) despite the presence of chromosome segregation defects in ~60% of anaphases may be explained by the resolution of those chromosome segregation defects by telophase,

an event that might escape our detection focused on anaphase cells. We also assessed condensin binding to chromatin by ChIP. Cells expressing the GFP-tagged Cnd2 subunit of condensin were arrested in prometaphase by using the cryosensitive *nda3-KM311* mutation and processed for ChIP against GFP. Mitotic arrest was achieved with similar efficiency in *cnd2-GFP* and *cnd2-GFP cut3-477* strains, as indicated by the septation indexes and the percentages of cells showing Cnd2-GFP enriched in the nucleus (Figure S1B) (Sutani *et al.* 1999). In good agreement with recent results (Tada *et al.* 2011), we found that the binding of Cnd2-GFP to centromere, rDNA, and several sites distributed along chromosome arms was reduced in a *cut3-477* background (Figure S1B). These data indicate that condensin binding and mitotic chromosome condensation are impaired in a *cut3-477* genetic background at 25° and 32°, although the *cut3-477* mutant strain is alive at these temperatures. This most likely renders the *cut3-477* strain hypersensitive to additional nonlethal mutations that alter the condensation process, such as *top2-250*. Therefore, screening for mutations synthetically lethal with *cut3-477* may lead to the identification of factors required for mitotic chromosome condensation.

Construction of a tester strain, *nmt41-cut3 cut3-477*

To screen for mutations synthetically lethal with *cut3-477*, we created the tester strain *nmt41-cut3 cut3-477*, which possesses the *cut3-477* mutation at the *cut3* locus plus a wild-type *cut3* gene whose expression is driven by the thiamine-repressible promoter *nmt41* (no message in thiamine) (Basi *et al.* 1993), inserted into the genome at an ectopic location. Because the *cut3-477* mutation is recessive (Saka *et al.* 1994), the tester strain should behave as a wild-type strain when grown in the absence of thiamine (*nmt41-cut3* expressed), but like a *cut3-477* mutant in the presence of thiamine (*nmt41-cut3* repressed). An asynchronous population of exponentially growing fission yeast cells contains ~10% of mitotic cells. As shown in Figure 1A, *nmt41-cut3 cut3-477* cells cultured in the absence of thiamine at 36° exhibited less than 2% of defective anaphases, but the frequency increased to 7% in the presence of thiamine, reaching a level similar to the *cut3-477* mutant. In contrast, the addition of thiamine to the growing medium did not modify the frequency of defective anaphases exhibited by *nmt41- \emptyset cut3-477* cells, bearing an empty *nmt41* plasmid. These data indicate that the *nmt41-cut3* gene complements, at least partly, the *cut3-477* mutation at 36° in the absence of thiamine, but not in the presence of 20 μ M thiamine. Furthermore, using the tester strain we observed a thiamine-dependent synthetic lethal genetic interaction between *top2-250* and *cut3-477* at 32° (Figure 1B). Thus, the strain *nmt41-cut3 cut3-477* behaves as a wild-type strain when it is cultured in the absence of thiamine, but like a *cut3-477* condensin mutant strain in the presence of thiamine.

Screening for mutations synthetically lethal with *cut3-477*

The tester strain was mutagenized with ethylmethane sulfonate and mutant colonies viable on synthetic medium without thiamine but dead on synthetic medium plus thiamine at 32° were selected. Mutants were subsequently backcrossed at least three times. The first backcross was performed with a wild-type strain (lacking both *nmt41-cut3* and *cut3-477*). This allowed us to eliminate secondary mutation in the *cut3-477* gene that were lethal at 32° because mutants bearing this type of mutation cannot produce *cut3-477* progenies viable at 32° in the absence of *nmt41-cut3*. This first backcross also allowed the elimination of mutations that conferred thiamine hypersensitivity, *i.e.*, mutants that produced progenies hypersensitive to thiamine regardless of *nmt41-cut3*. From ~180,000 colonies, 15 *slc* mutants (synthetically

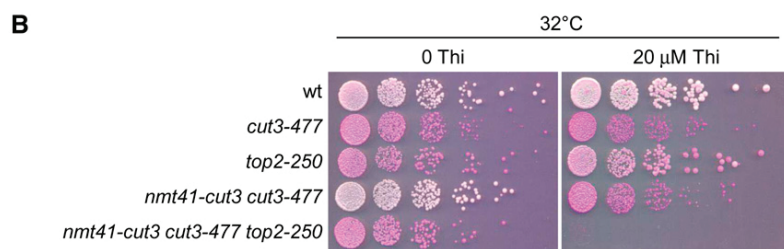
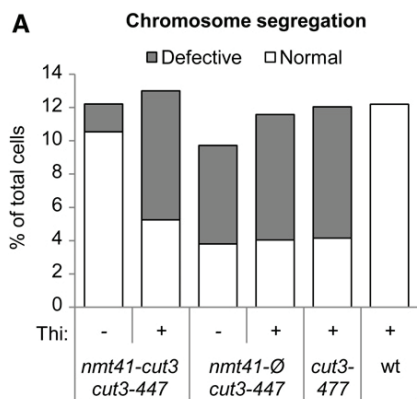


Figure 1 The *nmt41-cut3 cut3-477* tester strain. (A) Cell cultures in synthetic medium without thiamine (Thi) at 25° were split in two, and Thi (20 µM final) was added to one half. Cells were incubated at 25° for three doublings, shifted to 36° for three additional doublings, fixed, and stained with Hoechst 33342 to visualize DNA. Binucleated cells were examined for chromosome segregation defects ($n > 100$). (B) Cells grown in synthetic medium without Thi were serially diluted and spotted on synthetic medium plus phloxine B supplemented or not with Thi (20 µM final).

lethal with *cut3*) were selected (see Table 1). Representative examples are shown in Figure 2A. During the course of the backcrosses, we noticed that all *slc* mutants, except *slc129*, produced *cut3-477 slc* progenies devoid of the *nmt41-cut3* gene at 25°. Those *cut3-477 slc* double mutants were viable at 25° but dead at 32° (Figure 2B). Thus, the synthetically lethal interactions between the vast majority of *slc* mutations and *cut3-477* are thermo-dependent.

Genetic analyses

All *slc* mutations segregate 2:2 in crosses. They are recessive and organized into eight complementation groups, defining eight loci (Table 1). To test for allelism with expected hits, each *slc* locus was assessed for genetic linkage with chromosome condensation genes: condensin subunits *cut14*, *cnd1*, *cnd2*, and *cnd3*, *top2*, aurora-B and polo kinases, survivin, incenp, *pcs1*, and *mde4* (Tada *et al.* 2011). We observed a tight linkage between 3 *slc* loci (representing 10 mutations) and *cut14*, *cnd1*, or *cnd3*, and between a fourth *slc* locus and *ark1*, which encodes Aurora-B kinase. Sanger sequencing of those genes in candidate *slc* mutant backgrounds confirmed allelism. The 11 *slc* mutations were therefore renamed following the rule *gene name-mutation number*, e.g., the *slc71* mutation in the *cut14* gene was renamed *cut14-71* (Table 1). For the remaining *slc127*, *slc129*, *slc174*, and *slc185* loci, we observed no genetic linkage with any tested condensation gene, raising the possibility that these four loci could correspond to unknown chromosome condensation genes.

Phenotypic analyses

slc mutations might alter mitotic chromosome condensation. To test this, we examined chromosome segregation in *slc* single-mutant cells. Mitotic cells were identified by the presence of a mitotic spindle and examined for chromosome segregation defects. In wild-type cells, the migration of centromeres to the opposite poles of the mitotic spindle upon anaphase onset, and the movement of chromosome arms that ensues, lead to the formation of a mini chromatin bridge, which rapidly disappears as cells progress into late anaphase (Tada *et al.* 2011). We observed mini chromatin bridges on short mitotic spindles

with length comprised between 3 and 4 microns in wild-type cells (Figure 3A). However, these chromatin bridges disappeared as mitotic spindles increased to 5 microns in length, and passed this stage, chromosomes were almost always fully separated and clustered at the spindle poles (Figure 3, A and B). In sharp contrast, the four mutants, *slc127*, *slc129*, *slc174*, and *slc185*, exhibited frequent chromatin bridges and/or chromatin masses trailing on long anaphase spindle (>5 microns in length; Figure 3, A and B). Thus, chromosome migration during anaphase is altered in *slc127*, *slc129*, *slc174*, and *slc185* single-mutant cells.

Cut3 is an essential gene, and *slc* mutations may interfere with its expression. Similarly, a reduced expression of *top2* would most likely kill a *cut3-477* mutant strain. We therefore assessed by RT-qPCR the expression levels of each subunit of condensin and of *top2* in *slc127*, *slc129*, *slc174*, and *slc185* single-mutant cells cultured at 32° (Figure S2). We observed no obvious reduction in the steady state levels of either condensin or *top2* mRNA in any *slc* mutant, arguing against an indirect negative effect of *slc* mutations on the expression of these genes.

We assessed *slc* mutants for additional phenotypes. We observed no cryosensitivity for growth at 20° (data not shown). However, *slc127*, *slc129*, and *slc174*, as well as most *slc* mutants of the *Cut14* subunit of condensin, exhibited thermosensitivity for growth at 36° (Figure S3A). Condensin takes part in the attachment of kinetochores to microtubules during mitosis, and in the signaling and/or repair of DNA damage during interphase, as indicated by the hypersensitivity to hydroxyurea (HU) and ultraviolet light of *cut14-Y1* and *cnd2-1* mutants (Aono *et al.* 2002; Akai *et al.* 2011; Tada *et al.* 2011). To test for a possible role of *slc* genes in these processes, we examined the growth of *slc* mutants in the presence of increasing amounts of thia-benzazole, an inhibitor of microtubule polymerization, or in the presence of HU. The *cut14-71*, *slc127*, and *slc129* mutants, and to a lesser extent *ark1-190*, showed hypersensitivity to TBZ (Figure S3B). In addition, *slc127*, *slc129*, *slc174*, and *cnd1-175* were hypersensitive to HU (Figure S3C). However, we observed no hypersensitivity to ultraviolet radiation ranging from 50 to 100 J/m² (not shown).

Table 1 Genes identified in the screen

Gene Name	cut14	cnd1	cnd3	ark1	arp9	snf21	cph2	ulp2	nut2
Function	Condensin Smc2	Condensin non-Smc	Condensin non-Smc	Aurora-B kinase	Swi/Snf and RSC chromatin remodeling	RSC chromatin remodeling	Clr6S Histone deacetylase	Sumo deconjugating enzyme	Mediator
<i>slc</i> mutations	<i>slc71</i> <i>slc85</i> <i>slc90</i> <i>slc173</i> <i>slc179</i> <i>slc180</i>	<i>slc175</i> <i>slc181</i> <i>slc182</i>	<i>slc184</i>	<i>slc190</i>	<i>slc127</i>	<i>slc129</i>	<i>slc174</i>	<i>slc185</i>	<i>sup122</i>
Allele names	<i>cut14-71</i> <i>cut14-85</i> <i>cut14-90</i> <i>cut14-173</i> <i>cut14-179</i> <i>cut14-180</i>	<i>cnd1-175</i> <i>cnd1-181</i> <i>cnd1-182</i>	<i>cnd3-184</i>	<i>ark1-190</i>	<i>arp9-127</i>	<i>snf21-129</i>	<i>cph2-174</i>	<i>ulp2-185</i>	<i>nut2-122</i>
Protein	71: G397D 85: D656N 90: T652M 173: T652M 179: T652M 180: C631Y	175: G667E 181: G912D 182: R1117C	E195K	R241H	Q13 ^a	E524K	C453Y	R81C	M11

RSC, remodels the structure of chromatin.
^a STOP codon.

Identification of *slc* mutations

The *arp9* gene was cloned by functional complementation of the *slc127* thermosensitive phenotype using the pUR19-B1 genomic library (Barbet *et al.* 1992). Sequencing *arp9* in the *slc127* mutant strain revealed a C37T mutation (numbering starting from the ATG) that created a premature stop codon. The *slc127* mutation was therefore renamed *arp9-127*. We failed to clone the three other *slc* genes by functional complementation. Those genes were identified by an alternative approach combining next-generation, whole-genome sequencing of *slc* mutants strain and genetic mapping of *slc* point mutations. We identified 109 ± 8 SNPs in each *slc* mutant strains (File S1, File S2, File S3). First, pairwise comparisons of the lists of SNPs using a home-made script allowed us to identify 5 ± 3 SNPs that were unique to each mutant background. Second, each *slc* mutation was assigned to one chromosome by cosegregation analyses (Anders *et al.* 2008), further refining the number of candidate SNPs to 3 ± 2 per mutant genome. Finally, candidate single-base mutations were identified by genetic linkage analyses and confirmed by Sanger sequencing (Table 1). *slc129* corresponds to *snf21*, *slc174* to *cph2*, and *slc185* to *ulp2*. Except for *snf21*, which is an essential gene, we confirmed that deleting *arp9*, *cph2*, or *ulp2* was synthetically lethal with *cut3-477* at 32° (Figure S4).

nut2 is a suppressor of *cut3-477*

The *nmt41-cut3 cut3-477* tester strain forms pink colonies at 32° on synthetic medium supplemented with phloxine B and 20 μM thiamine (Figure 1B). During the screening procedure, we picked a mutant colony that remained white on synthetic medium plus phloxine B plus thiamine at 32°, suggesting a possible suppressive effect on *cut3-477*. Backcrosses confirmed the presence of a suppressor mutation, named *sup122*, distinct from the *cut3* locus and independent of *nmt41-cut3*, which restored the growth of *cut3-477* at restrictive temperature (Figure 4A). The *sup122* mutation segregates 2:2 in crosses and is recessive. Genome resequencing of the *sup122* mutant strain combined with genetic mapping revealed a point mutation in the nonessential *nut2* gene (Table 1 and File S4), and we confirmed that deleting *nut2* restored growth of *cut3-477* at 34° (Figure 4A). To investigate the mechanism through which the lack of *nut2* partly suppressed the thermosensitivity of *cut3-477*, we assessed chromosome segregation in *cut3-477 nut2Δ* double-mutant cells at 34° (Figure 4B). The frequency of defective anaphases was markedly reduced in *cut3-477 nut2Δ* cells compared with *cut3-477*, although chromosome segregation was altered in ~7% of anaphases in *nut2Δ*. Thus, *nut2* is required for normal chromosome segregation and its deficiency rescues chromosome segregation when condensin is impaired by the *cut3-477* mutation.

DISCUSSION

To identify genes that potentially interact with condensin to mediate chromatin interaction and compaction, we performed an unbiased genetic screen for genetic interaction partners of the Cut3/Smc4 ATPase subunit of condensin in fission yeast. This screen identified novel mutations in the condensin subunits Cut14, Cnd1, and Cnd3, and in Aurora-B kinase, which regulates condensin binding to chromatin (Tada *et al.* 2011), demonstrating its efficiency in identifying *bona fide* condensation factors. In addition, we isolated mutations in *arp9*, *snf21*, *cph2*, and *ulp2*, four genes not previously implicated in mitotic chromosome condensation in fission yeast. We show that all these mutations cause chromatin bridges and/or segregation anomalies in anaphase, consistent with defective chromosome condensation.

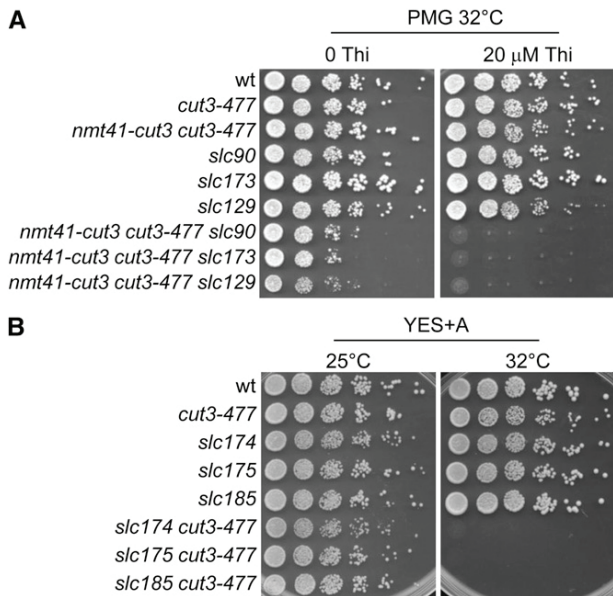


Figure 2 *slc* mutations are synthetically lethal with *cut3-477*. Strains of indicated genotypes were serially diluted and spotted onto (A) synthetic medium without thiamine (0 Thi) or supplemented with thiamine (20 μ M final) to repress transcription of the *nmt41-cut3* gene, or (B) onto complete medium.

In the course of this screen, we independently identified *nut2 Δ* as a suppressor of the thermosensitive growth and segregation defects caused by the condensin mutation *cut3-477*. Thus, Arp9, Snf21, Cph2, Ulp2, and Nut2 may play a role in mitotic chromosome condensation.

The presence of single alleles of *arp9*, *snf21*, *cph2*, or *ulp2* indicates that the screen is not saturated and therefore that additional genes synthetically lethal with *cut3* remain to be identified. Consistent with this, using high-throughput genetic interaction mapping Ryan *et al.* (2012) reported negative genetic interactions between *cut3* and at least 32 non-essential genes, including *ulp2*. Surprisingly, however, the screen failed to detect *arp9* and *cph2*, although *cph2* was present in the deletions library they used for screening.

The *cut14-71* mutation identified here confers hypersensitivity to TBZ. To the best of our knowledge, this is the first described mutation in condensin that confers pronounced TBZ hypersensitivity. The fact that among eight condensin mutants (seven *slc* alleles plus *cut3-477*), solely *cut14-71* exhibits this phenotype, suggests that this type of mutation may be rare. Pcs1 recruits condensin at the kinetochore

(Tada *et al.* 2011), and like *cut14-71*, *pcs1 Δ* is co-lethal with *cut3-477* and confers hypersensitivity to TBZ. Thus, *cut14-71* may affect the binding and/or the activity of condensin at the kinetochore in particular. *cut14-71* changes the glycine 397 of Cut14 into an aspartate. This residue is located at the very beginning of a coiled coil motif and is not conserved throughout evolution. Using the COILS program as a predictive tool (Lupas *et al.* 1991), we observed no disruption of the coiled-coil organization in the Cut14-71 mutant protein. Furthermore, Cut14 does not seem to directly contact the Pcs1/Mde4 monopolin complex (Tada *et al.* 2011). Thus, why *cut14-71* would have a specific impact on condensin at kinetochores remains enigmatic. The three other *slc* alleles of *cut14* (*slc85*, *slc90*, and *slc180*) all affect conserved residues located within the hinge domain. Notably, *slc90* affects a threonine residue conserved from bacteria to human and located near glycine patches clustered at the dimerization interface and essential for dimer formation and DNA binding (Hirano and Hirano 2002). Thus *slc85*, *slc90*, and *slc180* may weaken the interaction between the hinge domains of Cut3/Smc4 and Cut14/Smc2.

Arp9 is a subunit of the Swi/Snf and RSC (*i.e.*, remodels the structure of chromatin) chromatin remodeling complexes, whereas Snf21 is the ATP-dependent DNA helicase of RSC (Monahan *et al.* 2008). The fact that both *snf21-129* and *arp9-127* exhibit similar phenotypes, such as hypersensitivity to TBZ or HU, thermosensitivity, and the greatest frequency of chromatin bridges in anaphase at 32° among *slc* mutants, is consistent with their coexistence into functionally similar complexes. Arp9 may contribute to the association of RSC with chromatin as a heterodimer with Arp42 (Monahan *et al.* 2008), and lack of Arp42 or of the Snf5 subunit of Swi/Snf is synthetically sick in combination with *cut3-477* (Ryan *et al.* 2012). These data suggest that chromatin remodeling may play a role in chromosome condensation. ISWI chromatin remodeling complexes have been identified as major components of mitotic chromosomes assembled in *Xenopus laevis* egg extracts (MacCallum *et al.* 2002). However, the role of ISWI complexes in the formation of mitotic chromosome in this system appears rather limited. Furthermore, RSC has been implicated in multiple processes such as kinetochore function and recruitment of cohesin along chromosome arms (Hsu *et al.* 2003; Huang *et al.* 2004). Given the role of remodeling complexes as transcriptional coactivators, we cannot rule out the possibility that *snf21-129* and/or *arp9-127* mutations affect chromosome condensation indirectly. The hypersensitivity to HU of *snf2-129* and *arp9-127* mutants may reflect a defect in DNA replication during S phase, and the chromatin bridges exhibited by these mutants may stem, at least in part, from entry into mitosis with only partially replicated chromosomes. Alternatively, ATP-dependent chromatin remodeling may play an active role in the binding of condensin to “open” chromatin at promoters of

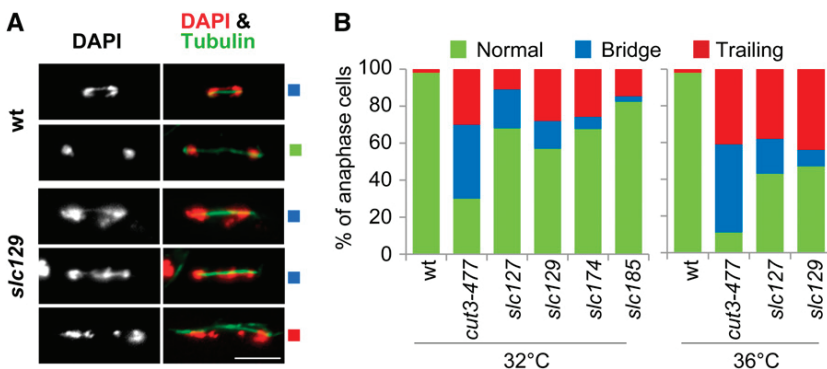


Figure 3 Defective chromosome migration during anaphase in *slc* mutant cells. (A) Chromosome segregation in cells fixed and processed for immunofluorescence against α -tubulin (Tubulin). DNA was stained with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI). Bar: 5 μ m. (B) Frequencies of chromosome segregation defects in late anaphase. Cells were fixed, processed for tubulin staining, and examined for chromosome segregation defects in late anaphase (spindle $>5 \mu$ m, $n > 100$). Left panel: cells were cultured and fixed at 32°. Right panel: cells cultured at 32° were shifted at 36° for 2.5 hr and fixed at 36°.

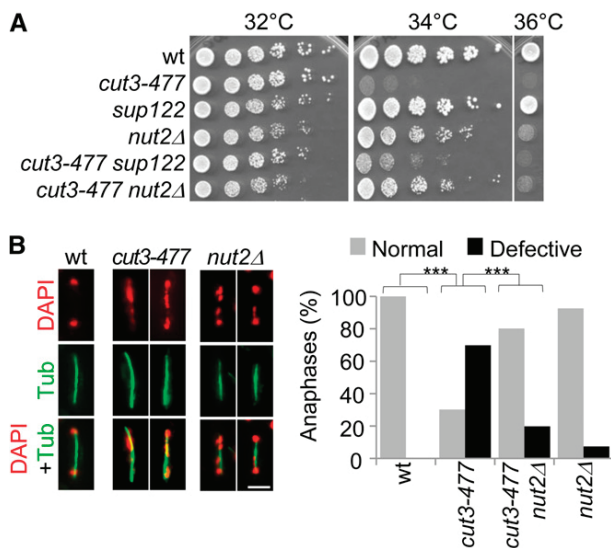


Figure 4 The lack of *nut2* partly compensates for *cut3-477* deficiency. (A) Cells of indicated genotypes were serially diluted and spotted onto complete medium. (B) Cells exponentially growing at 30° were shifted at 34° for one generation, fixed, and processed for immunofluorescence against α -tubulin (Tub) and DNA staining with DAPI. Bar, 5 μ m. Chromosome segregation was assessed in late anaphase cells (spindle >5 μ m, n > 100). ****P* < 0.001, χ^2 test.

active genes (see herein). Further work is required to determine whether or not the link we describe here between chromatin remodeling complexes and condensin is direct.

Cph2 is a zinc finger PHD domain protein associated with the Clr6 histone deacetylase within a complex called Clr6 II, which deacetylates histones mostly within coding regions of the genome (Nicolas *et al.* 2007). Clr6 II is the functional counterpart of budding yeast RPD3S, and RPD3-dependent deacetylation of histone H4-K5/K12 has been implicated in the recruitment of condensin onto rDNA in budding yeast in response to starvation (Tsang *et al.* 2007). Clr6 contributes to the regulation of condensin binding to retrotransposons in fission yeast through the deacetylation of H3-K56 (Tanaka *et al.* 2012), and the lack of Alp13, a nonessential subunit of Clr6 II, has been shown to cause chromosome segregation anomalies similar to those associated with defects in condensation (Nakayama *et al.* 2003). We found that, like *cph2Δ*, *alp13Δ* was lethal with *cut3-477* at 32° (see Figure S5). Thus, Cph2 may influence condensin association with chromatin as part of the Clr6 II histone deacetylase complex. Clr6 II may contribute to chromosome condensation by modulating the level of acetylation of nucleosomes, but possibly also of condensin itself, as suggested for the related cohesin complex (Kagami *et al.* 2011).

Ulp2 is a sumo-specific protease that plays a dual role in the cycle of sumoylation/desumoylation of proteins. Sumo (small ubiquitin-related modifier) is a reversible posttranslational protein modifier that is synthesized into an inactive proform. Ulp2 cleaves Sumo propeptide into a mature form that can be conjugated to target proteins, and, through its protease activity, also allows the de-sumoylation of target proteins (Geiss-Friedlander and Melchior 2007). Budding yeast *ULP2* has been identified as a multicopy suppressor of the *smc2-6* allele of condensin, and lack of *ULP2* is lethal with *smc4-1* (Bachelier-Bassi *et al.* 2008; Strunnikov *et al.* 2001). Thus, Ulp2 seems to play a positive role in chromosome condensation that is conserved in budding and fission yeasts. The targets of Ulp2 in this pathway may be multiple,

including topoisomerases and/or condensin. Sumoylation of condensin subunits has been observed and is necessary for condensin recruitment to the rDNA repeats during anaphase (D'Amours *et al.* 2004; Takahashi *et al.* 2008). However, the underlying mechanism remains elusive. Ulp2 may play a positive role in this pathway because it seems required for the rDNA enrichment of Smc4-GFP (Strunnikov *et al.* 2001).

Nut2 is a component of the mediator complex, which physically associates with DNA binding transcription factors and RNA polymerase II. Through these contacts, mediator assists the recruitment of RNA polymerase II to genes promoters and integrates regulatory signals for transcription (Conaway and Conaway 2011). Mediator can stimulate or repress transcription and its subunits exhibit gene-specific effects. The origin of the chromosome segregation defects in *nut2Δ* cells remains undetermined. However, the fact that the lack of Nut2 improves chromosome segregation in *cut3-477* cells strongly suggests that the lack of Nut2 liberates a condensation activity that is limiting in a *cut3-477* background, and, therefore, that Nut2 plays a negative role in chromosome condensation. The restored growth of the *cut3-477 nut2Δ* double mutant at 34° compared with *cut3-477* most likely stems from the improved chromosome segregation. Nut2 may be required for the transcription of a negative regulator of chromosome condensation. Alternatively, given that transcription and condensin binding are antagonistic (Clemente-Blanco *et al.* 2009), an overall reduction in transcription caused by the lack of Nut2 may facilitate condensin binding to chromatin.

A recent report indicates that increasing cohesin occupancy on chromosomes by eliminating the destabilizing activity of Wapl leads to a substantial increase in the compaction of chromosomes (Tedeschi *et al.* 2013). Mediator and cohesin physically interacts and cooccupy active genes in human cells (Kagey *et al.* 2010). Thus, lack of Nut2 may compensate for condensin deficiency by increasing cohesin occupancy. However, we think this is unlikely because the lack of fission yeast Wapl (*wpl1Δ*) does not restore growth of *cut3-477* condensin mutant (Figure S6). Rather, given the overlap that seems to exist between condensin and cohesin for their loading onto chromosomes (D'Ambrosio *et al.* 2008), mediator may play a direct role in chromosome condensation through the recruitment of condensin onto chromatin, and Nut2 may negatively regulate this pathway.

One characteristic of condensin I and II complexes that recently emerged from genome-wide mapping experiments in budding and fission yeasts, *C. elegans*, chicken DT40 cells, and mouse embryonic stem cells is that both complexes are enriched at promoters of active genes (D'Ambrosio *et al.* 2008; Downen *et al.* 2013; Kim *et al.* 2013; Kranz *et al.* 2013). The bacterial condensin of *Bacillus subtilis* also binds in the vicinity of highly expressed genes (Gruber and Errington 2009). Therefore, transcription somehow influences the binding of condensin complexes to chromosomes. Remarkably, four of the five "non-condensin" genes identified in this screen—*arp9*, *snf21*, *cph2*, and *nut2*—are implicated in transcription in eukaryotes. Swi/snf and RSC chromatin remodelers alter nucleosome positioning at gene promoters, thereby exposing DNA to the transcriptional machinery. Clr6 II/RPD3S deacetylates histones within the coding region of genes thereby promoting chromatin reformation in the wake of RNA polymerase II and prohibiting antisense transcription (Nicolas *et al.* 2007; Venkatesh *et al.* 2012). Furthermore, if we consider all known genetic interaction partners with *cut3* referenced in the pombase database (Wood *et al.* 2012), 28% (11/39) are linked to transcription. Although we cannot exclude the possibility of a role in pathways related to topo II and/or RCA, it is tempting to speculate that this enrichment in transcription cofactors reflects a link between condensin binding to

chromosomes and high transcription rate. Local chromatin features established with transcription may play a role in condensin association with chromosome in eukaryotes. Overall, this genetic screen reinforces the idea of a tight functional interplay between condensin association with chromatin and transcriptional processes.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank J. P. Javerzat in whose lab the tester strain *nmt41-cut3 cut3-477* was created, the Yeast Genetic Resource Center for strains, K. Gull for Tat1 antibody and F. Palladino, G. Yvert, and V. Vanoosthuysse for comments on the manuscript. X. R. was supported by a postdoctoral fellowship from the CNRS and L. F. by a PhD studentship from la Ligue Contre le Cancer. This work was supported by an ATIP grant from CNRS to P.B.

LITERATURE CITED

- Akai, Y., Y. Kurokawa, N. Nakazawa, Y. Tonami-Murakami, Y. Suzuki *et al.*, 2011 Oposing role of condensin hinge against replication protein A in mitosis and interphase through promoting DNA annealing. *Open Biol.* 1: 110023.
- Anders, A., S. Watt, J. Bahler, and K. E. Sawin, 2008 Improved tools for efficient mapping of fission yeast genes: identification of microtubule nucleation modifier *mod22-1* as an allele of chromatin-remodelling factor gene *swr1*. *Yeast* 25: 913–925.
- Aono, N., T. Sutani, T. Tomonaga, S. Mochida, and M. Yanagida, 2002 Cnd2 has dual roles in mitotic condensation and interphase. *Nature* 417: 197–202.
- Bachellier-Bassi, S., O. Gadal, G. Bourout, and U. Nehrass, 2008 Cell cycle-dependent kinetochore localization of condensin complex in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Struct. Biol.* 162: 248–259.
- Bahler, J., J. Q. Wu, M. S. Longtine, N. G. Shah, A. McKenzie, 3rd *et al.*, 1998 Heterologous modules for efficient and versatile PCR-based gene targeting in *Schizosaccharomyces pombe*. *Yeast* 14: 943–951.
- Barbet, N., W. J. Muriel, and A. M. Carr, 1992 Versatile shuttle vectors and genomic libraries for use with *Schizosaccharomyces pombe*. *Gene* 114: 59–66.
- Basi, G., E. Schmid, and K. Maundrell, 1993 TATA box mutations in the *Schizosaccharomyces pombe* *nmt1* promoter affect transcription efficiency but not the transcription start point or thiamine repressibility. *Gene* 123: 131–136.
- Baxter, J., N. Sen, V. L. Martinez, M. E. De Carandini, J. B. Schwartzman *et al.*, 2011 Positive supercoiling of mitotic DNA drives decatenation by topoisomerase II in eukaryotes. *Science* 331: 1328–1332.
- Baxter, J., and L. Aragon, 2012 A model for chromosome condensation based on the interplay between condensin and topoisomerase II. *Trends Genet.* 28: 110–117.
- Bernard, P., J. Drogat, S. Dheur, S. Genier, and J. P. Javerzat, 2010 Splicing factor Spf30 assists exosome-mediated gene silencing in fission yeast. *Mol. Cell Biol.* 30: 1145–1157.
- Clemente-Blanco, A., M. Mayan-Santos, D. A. Schneider, F. Machin, A. Jarmuz *et al.*, 2009 Cdc14 inhibits transcription by RNA polymerase I during anaphase. *Nature* 458: 219–222.
- Clemente-Blanco, A., N. Sen, M. Mayan-Santos, M. P. Sacristan, B. Graham *et al.*, 2011 Cdc14 phosphatase promotes segregation of telomeres through repression of RNA polymerase II transcription. *Nat. Cell Biol.* 13: 1450–1456.
- Conaway, R. C., and J. W. Conaway, 2011 Function and regulation of the Mediator complex. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 21: 225–230.
- Cuylen, S., and C. H. Haering, 2011 Deciphering condensin action during chromosome segregation. *Trends Cell Biol.* 21: 552–559.
- Cuylen, S., J. Metz, and C. H. Haering, 2011 Condensin structures chromosomal DNA through topological links. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 18: 894–901.
- D'Ambrosio, C., C. K. Schmidt, Y. Katou, G. Kelly, T. Itoh *et al.*, 2008 Identification of cis-acting sites for condensin loading onto budding yeast chromosomes. *Genes Dev.* 22: 2215–2227.
- D'Amours, D., F. Stegmeier, and A. Amon, 2004 Cdc14 and condensin control the dissolution of cohesin-independent chromosome linkages at repeated DNA. *Cell* 117: 455–469.
- Downen, J. M., S. Bilodeau, D. A. Orlando, M. R. Hübner, B. J. Abraham *et al.*, 2013 Multiple structural maintenance of chromosome complexes at transcriptional regulatory elements. *Stem Cell Rev.* 1: 371–378.
- Geiss-Friedlander, R., and F. Melchior, 2007 Concepts in sumoylation: a decade on. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8: 947–956.
- Gerlich, D., T. Hirota, B. Koch, J. M. Peters, and J. Ellenberg, 2006 Condensin I stabilizes chromosomes mechanically through a dynamic interaction in live cells. *Curr. Biol.* 16: 333–344.
- Gruber, S., and J. Errington, 2009 Recruitment of condensin to replication origin regions by ParB/SpoOJ promotes chromosome segregation in *B. subtilis*. *Cell* 137: 685–696.
- Haeusler, R. A., M. Pratt-Hyatt, P. D. Good, T. A. Gipson, and D. R. Engelke, 2008 Clustering of yeast tRNA genes is mediated by specific association of condensin with tRNA gene transcription complexes. *Genes Dev.* 22: 2204–2214.
- Hirano, M., and T. Hirano, 2002 Hinge-mediated dimerization of SMC protein is essential for its dynamic interaction with DNA. *EMBO J.* 21: 5733–5744.
- Hirano, T., 2012 Condensins: universal organizers of chromosomes with diverse functions. *Genes Dev.* 26: 1659–1678.
- Hsu, J. M., J. Huang, P. B. Meluh, and B. C. Laurent, 2003 The yeast RSC chromatin-remodeling complex is required for kinetochore function in chromosome segregation. *Mol. Cell Biol.* 23: 3202–3215.
- Huang, J., J. M. Hsu, and B. C. Laurent, 2004 The RSC nucleosome-remodeling complex is required for Cohesin's association with chromosome arms. *Mol. Cell* 13: 739–750.
- Hudson, D. F., K. M. Marshall, and W. C. Earnshaw, 2009 Condensin: architect of mitotic chromosomes. *Chromosome Res.* 17: 131–144.
- Iwasaki, O., A. Tanaka, H. Tanizawa, S. I. Grewal, and K. Noma, 2010 Centromeric localization of dispersed Pol III genes in fission yeast. *Mol. Biol. Cell* 21: 254–265.
- Kagami, A., T. Sakuno, Y. Yamagishi, T. Ishiguro, T. Tsukahara *et al.*, 2011 Acetylation regulates monopolar attachment at multiple levels during meiosis I in fission yeast. *EMBO Rep.* 12: 1189–1195.
- Kagey, M. H., J. J. Newman, S. Bilodeau, Y. Zhan, D. A. Orlando *et al.*, 2010 Mediator and cohesin connect gene expression and chromatin architecture. *Nature* 467: 430–435.
- Kim, J. H., T. Zhang, N. C. Wong, N. Davidson, J. Maksimovic *et al.*, 2013 Condensin I associates with structural and gene regulatory regions in vertebrate chromosomes. *Nat Commun.* 4: 2537.
- Kimura, K., M. Hirano, R. Kobayashi, and T. Hirano, 1998 Phosphorylation and activation of 13S condensin by Cdc2 in vitro. *Science* 282: 487–490.
- Kranz, A. L., C. Y. Jiao, L. H. Winterkorn, S. E. Albritton, M. Kramer *et al.*, 2013 Genome-wide analysis of condensin binding in *Caenorhabditis elegans*. *Genome Biol.* 14: R112.
- Liu, W., B. Tanasa, O. V. Tyurina, T. Y. Zhou, R. Gassmann *et al.*, 2010 PHF8 mediates histone H4 lysine 20 demethylation events involved in cell cycle progression. *Nature* 466: 508–512.
- Losada, A., and T. Hirano, 2005 Dynamic molecular linkers of the genome: the first decade of SMC proteins. *Genes Dev.* 19: 1269–1287.
- Lupas, A., M. Van Dyke, and J. Stock, 1991 Predicting coiled coils from protein sequences. *Science* 252: 1162–1164.
- MacCallum, D. E., A. Losada, R. Kobayashi, and T. Hirano, 2002 ISWI remodeling complexes in *Xenopus* egg extracts: identification as major chromosomal components that are regulated by INCENP-aurora B. *Mol. Biol. Cell* 13: 25–39.
- Monahan, B. J., J. Villen, S. Marguerat, J. Bahler, S. P. Gygi *et al.*, 2008 Fission yeast SWI/SNF and RSC complexes show compositional and functional differences from budding yeast. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 15: 873–880.
- Moreno, M. B., A. Duran, and J. C. Ribas, 2000 A family of multifunctional thiamine-repressible expression vectors for fission yeast. *Yeast* 16: 861–872.
- Moreno, S., A. Klar, and P. Nurse, 1991 Molecular genetic analysis of fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Methods Enzymol.* 194: 795–823.

- Nakayama, J., G. Xiao, K. Noma, A. Malikzay, P. Bjerling *et al.*, 2003 Alp13, an MRG family protein, is a component of fission yeast Clr6 histone deacetylase required for genomic integrity. *EMBO J.* 22: 2776–2787.
- Nakazawa, N., T. Nakamura, A. Kokubu, M. Ebe, K. Nagao *et al.*, 2008 Dissection of the essential steps for condensin accumulation at kinetochores and rDNAs during fission yeast mitosis. *J. Cell Biol.* 180: 1115–1131.
- Nicolas, E., T. Yamada, H. P. Cam, P. C. Fitzgerald, R. Kobayashi *et al.*, 2007 Distinct roles of HDAC complexes in promoter silencing, anti-sense suppression and DNA damage protection. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 14: 372–380.
- Ohta, S., J. C. Bukowski-Wills, L. Sanchez-Pulido, L. Alves Fde, L. Wood *et al.*, 2010 The protein composition of mitotic chromosomes determined using multiclassifier combinatorial proteomics. *Cell* 142: 810–821.
- Piazza, I., C. H. Haering, and A. Rutkowska, 2013 Condensin: crafting the chromosome landscape. *Chromosoma* 122: 175–190.
- Ryan, C. J., A. Roguev, K. Patrick, J. Xu, H. Jahari *et al.*, 2012 Hierarchical modularity and the evolution of genetic interactomes across species. *Mol. Cell* 46: 691–704.
- Saka, Y., T. Sutani, Y. Yamashita, S. Saitoh, M. Takeuchi *et al.*, 1994 Fission yeast cut3 and cut14, members of a ubiquitous protein family, are required for chromosome condensation and segregation in mitosis. *EMBO J.* 13: 4938–4952.
- St-Pierre, J., M. Douziech, F. Bazile, M. Pascariu, E. Bonneil *et al.*, 2009 Polo kinase regulates mitotic chromosome condensation by hyperactivation of condensin DNA supercoiling activity. *Mol. Cell* 34: 416–426.
- Strunnikov, A. V., L. Aravind, and E. V. Koonin, 2001 *Saccharomyces cerevisiae* SMT4 encodes an evolutionarily conserved protease with a role in chromosome condensation regulation. *Genetics* 158: 95–107.
- Sutani, T., T. Yuasa, T. Tomonaga, N. Dohmae, K. Takio *et al.*, 1999 Fission yeast condensin complex: essential roles of non-SMC subunits for condensation and Cdc2 phosphorylation of Cut3/SMC4. *Genes Dev.* 13: 2271–2283.
- Tada, K., H. Susumu, T. Sakuno, and Y. Watanabe, 2011 Condensin association with histone H2A shapes mitotic chromosomes. *Nature* 474: 477–483.
- Takahashi, Y., S. Dulev, X. Liu, N. J. Hiller, X. Zhao *et al.*, 2008 Cooperation of sumoylated chromosomal proteins in rDNA maintenance. *PLoS Genet.* 4: e1000215.
- Tanaka, A., H. Tanizawa, S. Sriswasdi, O. Iwasaki, A. G. Chatterjee *et al.*, 2012 Epigenetic regulation of condensin-mediated genome organization during the cell cycle and upon DNA damage through histone H3 lysine 56 acetylation. *Mol. Cell* 48: 532–546.
- Tedeschi, A., G. Wutz, S. Huet, M. Jaritz, A. Wuensche *et al.*, 2013 Wapl is an essential regulator of chromatin structure and chromosome segregation. *Nature* 501: 564–568.
- Tsang, C. K., H. Li, and X. S. Zheng, 2007 Nutrient starvation promotes condensin loading to maintain rDNA stability. *EMBO J.* 26: 448–458.
- Vagnarelli, P., D. F. Hudson, S. A. Ribeiro, L. Trinkle-Mulcahy, J. M. Spence *et al.*, 2006 Condensin and Repo-Man-PP1 co-operate in the regulation of chromosome architecture during mitosis. *Nat. Cell Biol.* 8: 1133–1142.
- Venkatesh, S., M. Smolle, H. Li, M. M. Gogol, M. Saint *et al.*, 2012 Set2 methylation of histone H3 lysine 36 suppresses histone exchange on transcribed genes. *Nature* 489: 452–455.
- Wood, V., M. A. Harris, M. D. McDowall, K. Rutherford, B. W. Vaughan *et al.*, 2012 PomBase: a comprehensive online resource for fission yeast. *Nucleic Acids Res.* 40: D695–D699.
- Woods, A., T. Sherwin, R. Sasse, T. H. MacRae, A. J. Baines *et al.*, 1989 Definition of individual components within the cytoskeleton of *Trypanosoma brucei* by a library of monoclonal antibodies. *J. Cell Sci.* 93: 491–500.
- Xing, H., N. L. Vanderford, and K. D. Sarge, 2008 The TBP-PP2A mitotic complex bookmarks genes by preventing condensin action. *Nat. Cell Biol.* 10: 1318–1323.

Communicating editor: C. S. Hoffman

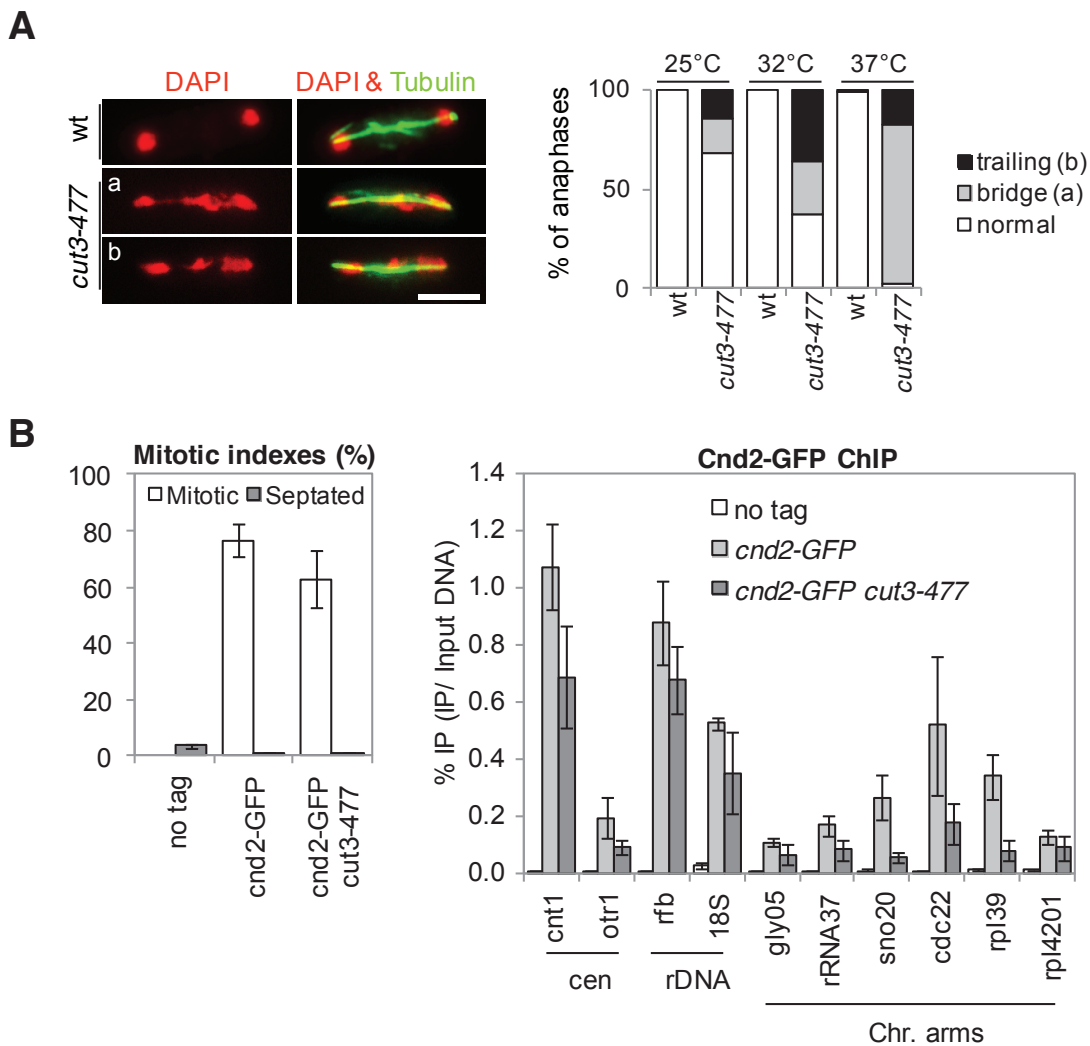


Figure S1 Characterization of the thermosensitive *cut3-477* condensin mutant

A. Cells grown at 25°C, 32°C or shifted from 25°C to 37°C and further incubated for 2 hours were fixed and processed for immunofluorescence against α -tubulin (Tubulin). DNA was stained with 4', 6'-diamidino-2-phenylindole (DAPI). Two representative *cut3-477* mutant cells exhibiting chromatin bridge (a) or trailing chromatin (b) are shown. Bar: 5 μ m. Frequencies were determined by scoring at least 100 anaphase cells (mitotic spindle > 5 μ m). **B.** Indicated strain were arrested in prometaphase at 17°C by using the *nda3-KM311* mutation and processed for ChIP against GFP. % IP correspond to the average and mean deviation obtained from 3 independent ChIPs. Mitotic arrests were assessed by scoring cells exhibiting nuclear Cnd2-GFP signals (Mitotic) and septated cells (Septated). Average and mean deviation calculated from three independent cultures are indicated.

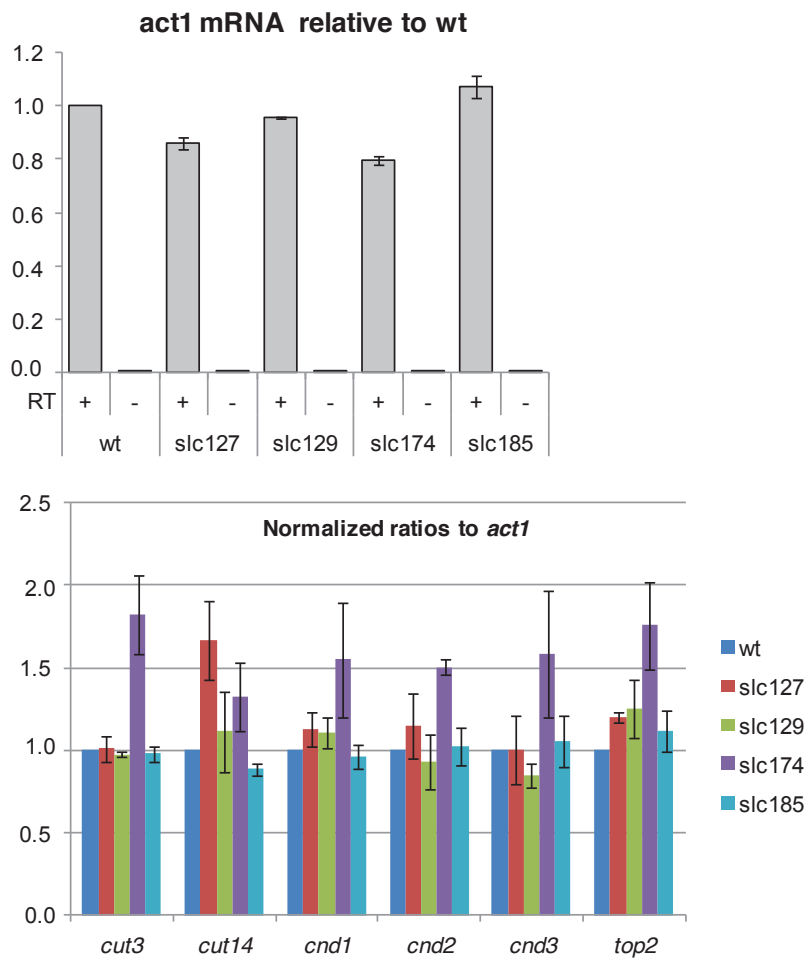


Figure S2 *slc* mutations do not significantly reduce condensin and top2 steady state mRNA levels.

Total RNA was extracted from cells exponentially growing at 32°C throughout the experiment. 500 ng of total RNA was reverse-transcribed in the presence (+) or absence (-) of Reverse Transcriptase (RT) and cDNAs were quantified by real time qPCR. Indicated values correspond to average and mean deviation from two independent experiments with two independent reverse transcriptions per experiment.

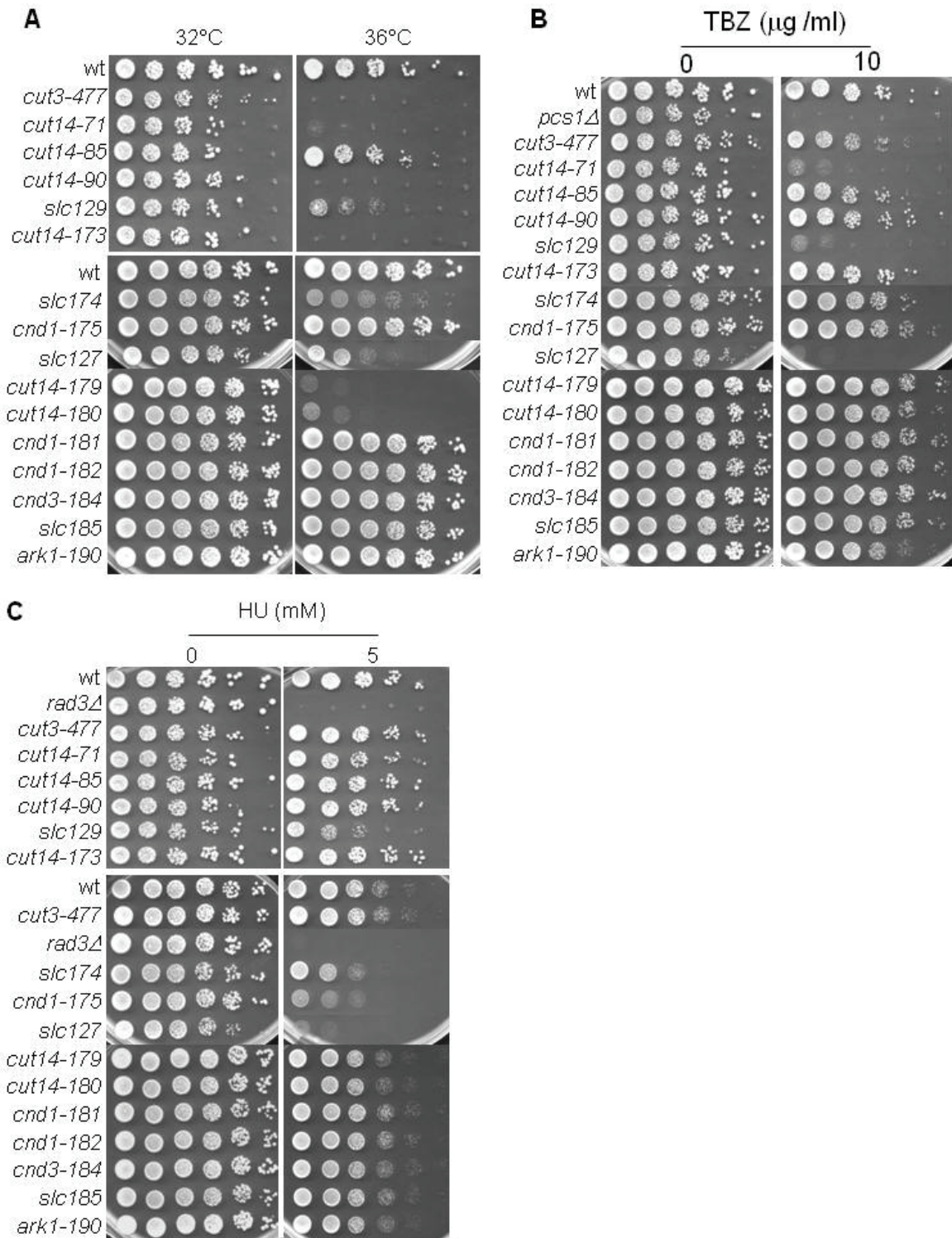


Figure S3 Macroscopic phenotypes of *slc* mutants

Strains of indicated genotypes were serially diluted and spotted onto indicated YES+A media. Growth in the presence of TBZ or HU was assessed at 32°C.

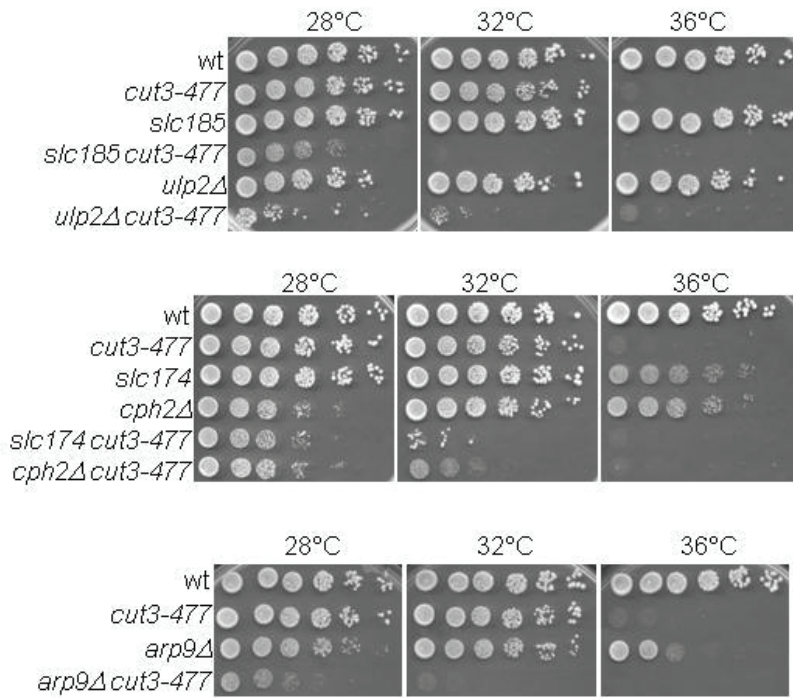


Figure S4 Negative genetic interaction between *ulp2*, *cph2* or *arp9* and *cut3*
 Strains of indicated genotypes were serially diluted and spotted onto complete YES+A medium.

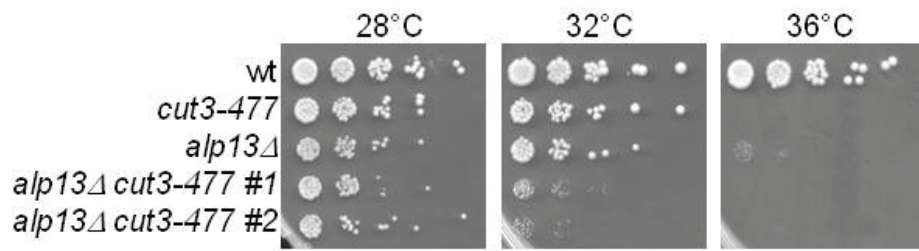


Figure S5 *cut3-477* confers hypersensitivity to the lack of *alp13*

Strains of indicated genotypes were serially diluted and spotted on complete medium

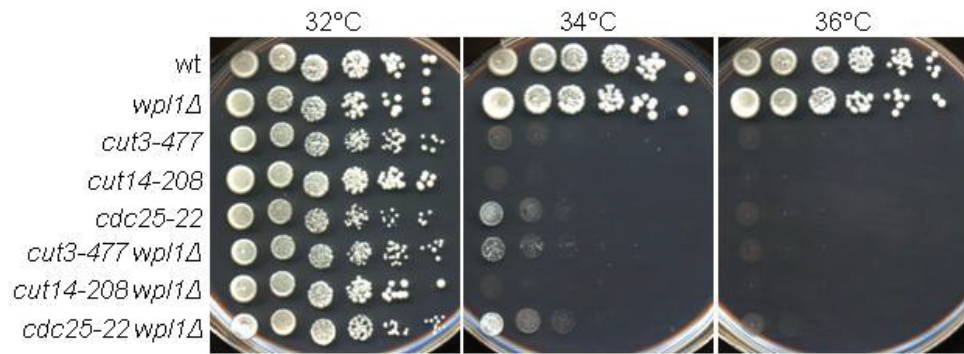


Figure S6 Lack of Wpl1 does not suppress the thermosensitive growth phenotype of condensin mutants

Strains of indicated genotypes were serially diluted and spotted onto complete medium. Plates were incubated for 4 days. Thermosensitive *cdc25-22* was used as a specificity control.

Table S1 Strains used in this study

number	genotype	origin
LY113	<i>h- leu1-32 ura4D18 ade6-210</i>	Lab stock
LY45	<i>h- leu1-32 ura4D18 cut3-477</i>	YGRC
LY270	<i>h- leu1-32 ura4D18 nda3-KM311</i>	Lab stock
LY1802	<i>h- leu1-32 ura4D18 or DS/E nda3-KM311 cnd2-gfp-LEU2</i>	YGRC
LY2046	<i>h- leu1-32 ura4D18 or DS/E cut3-477 nda3-KM311 cnd2-gfp-LEU2</i>	Lab stock
LY78	<i>h- leu1-32 cut3-477 pREP41XL-cut3-LEU2</i>	Lab stock
LY69	<i>h- leu1-32 cut3-477 pREP41XL-LEU2</i>	Lab stock
LY42	<i>h- leu1-32 top2-250</i>	YGRC
LY75	<i>h- leu1-32 cut3-477 top2-250 pREP41XL-cut3-LEU2</i>	Lab stock
LY1064	<i>h- leu1-32 ura4D18 ade6-210 slc71</i>	Lab stock
LY862	<i>h- leu1-32 ura4D18 ade6-210 slc85</i>	Lab stock
LY646	<i>h- leu1-32 ura4D18 or DS/E slc90</i>	Lab stock
LY1241	<i>h+ leu1-32 ura4D18 or DS/E ade6-210 slc127</i>	Lab stock
LY962	<i>h- leu1-32 ura4D18 or DS/E ade6-216 slc129</i>	Lab stock
LY858	<i>h- leu1-32 ura4D18 or DS/E ade6-216 slc173</i>	Lab stock
LY1259	<i>h+ leu1-32 ade6-210 slc174</i>	Lab stock
LY1261	<i>h+ leu1-32 ura4D18 or DS/E ade6-210 slc175</i>	Lab stock
LY1250	<i>h- leu1-32 ura4D18 or DS/E ade6-210 slc179</i>	Lab stock
LY1252	<i>h- leu1-32 ura4D18 or DS/E ade6-210 slc180</i>	Lab stock
LY1264	<i>h- leu1-32 ura4D18 or DS/E ade6-210 slc181</i>	Lab stock
LY1266	<i>h- leu1-32 ura4D18 or DS/E ade6-210 slc182</i>	Lab stock
LY1268	<i>h- leu1-32 ura4D18 or DS/E ade6-210 slc184</i>	Lab stock
LY1269	<i>h- leu1-32 ura4D18 or DS/E ade6-210 slc185</i>	Lab stock
LY1271	<i>h- leu1-32 ade6-210 slc190</i>	Lab stock
LY904	<i>h- leu1-32 ura4D18 or DS/E ade6-216 cut3-477 sup122</i>	Lab stock
LY480	<i>h- ura4D18 rad3Δ::ura4+</i>	YGRC
LY28	<i>h- leu1-32 ura4D18 ade6-210 pcs1Δ::ura4+</i>	JP Javerzat
LY2625	<i>h+ leu1-32 ura4D18 ade6-210 arp9Δ::NatR</i>	Lab stock
LY2601	<i>h+ leu1-32 ura4D18 ade6-216 cph2Δ::NatR</i>	Lab stock
LY2602	<i>h+ leu1-32 ura4D18 ade6-216 ulp2Δ::NatR</i>	Lab stock
LY2626	<i>h+ leu1-32 ura4D18 ade6-216 nut2Δ::NatR</i>	Lab stock
LY1948	<i>h- leu1-32 ura4D18 ade6-210 alp13Δ::NatR</i>	Lab stock
LY662	<i>h+ leu1-32 ura4D18 wpl1Δ::kanR</i>	JP Javerzat

La condensation mitotique des chromosomes est l'un des mécanismes assurant la transmission fidèle de l'information génétique. Les complexes condensines et leur association à la chromatine sont nécessaires à cette condensation. Cependant, les mécanismes par lesquels ces complexes s'associent aux chromosomes et contribuent à leur condensation sont mal compris. L'objectif de ma thèse était d'identifier et de caractériser des facteurs de condensation encore inconnus collaborant avec le complexe condensine présent chez *S. pombe*. Par un crible génétique, nous avons recherché des mutants viables lorsque le complexe condensine est complètement fonctionnel mais morts lorsque ce complexe est partiellement défectif. Nous avons ainsi identifié 7 protéines jusqu'alors jamais impliquées dans la condensation mitotique. Parmi ces dernières, nous avons identifié des protéines impliquées dans le remodelage de la chromatine et des facteurs de transcription comme Gcn5, une HAT très conservée, connue pour son rôle de coactivateur de la transcription ; suggérant un lien entre la condensation et la machinerie transcriptionnelle. Gcn5 s'associe à la chromatine au niveau des promoteurs des gènes où elle acétyle principalement H3K9, H3K14 et H3K18. Sa présence au niveau des promoteurs est directement corrélée avec le niveau de transcription des gènes correspondants. Bien que la majorité de la chromatine soit dé-acétylée et que la présence de Gcn5 soit réduite au niveau des chromosomes en mitose, des traces de H3K9 acétylée persistent au niveau de certains promoteurs. Nos résultats suggèrent que cette acétylation persistante pourrait être liée au recrutement du complexe condensine à la chromatine.

From yeasts to human, Condensin is essential for mitotic chromosome condensation. However, how Condensin binds to chromatin and, in this context, shapes mitotic chromosome remain poorly understood. Mappings performed from yeasts to mouse have revealed that condensin is enriched near highly expressed genes along chromosome arms, suggesting that as yet identified features associated with transcription take part in condensin binding to chromatin. To identify factors that collaborate with Condensin we performed a synthetically lethal genetic screen in fission yeast. We searched for mutants that are alive when Condensin is fully functional but dead when Condensin is partly defective. We identified 7 proteins never known for their roles in the mitotic condensation, such as some chromatin remodelling and some transcription factors. All these results were consistent with a link between condensation and transcription. Among these 7 proteins, we found Gcn5, which encodes a conserved HAT, well known for the role it plays as a transcriptional co-activator. Gcn5 binds to gene promoters where it acetylates mainly H3K9, K14 and K18, and its occupancy correlates with transcription rates. Remarkably, although the bulk of chromatin is de-acetylated and Gcn5 reduced from chromatin upon mitosis entry, traces of Gcn5 dependant H3K9 acetylated persist at condensin binding sites. Here, we provide evidence that Gcn5-mediated histone H3-K9 acetylation could assist the binding of Condensin to chromatin.