



Rôles des télomères internes et des condensines dans la cassure des chromosomes dicentriques par la cytodiérèse chez *Saccharomyces cerevisiae*

Thomas Guérin Guérin

► To cite this version:

Thomas Guérin Guérin. Rôles des télomères internes et des condensines dans la cassure des chromosomes dicentriques par la cytodiérèse chez *Saccharomyces cerevisiae*. Biologie moléculaire. Université Paris Saclay (COMUE), 2018. Français. NNT : 2018SACLS581 . tel-02426254

HAL Id: tel-02426254

<https://theses.hal.science/tel-02426254>

Submitted on 2 Jan 2020

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.

Rôles des Télomères Internes et des Condensines dans la Cassure des Chromosomes Dicentriques par la Cytodiérèse chez *Saccharomyces cerevisiae*

Thèse de doctorat de l'Université Paris-Saclay
préparée à Paris-Sud

École doctorale n°577 ED-SDSV
Structure et dynamique des systèmes vivants
Spécialité Sciences de la Vie et de la Santé

Thèse présentée et soutenue à Fontenay-aux-Roses le 12 décembre 2018

Thomas Guérin

Composition du Jury :

Dr. Maria Teresa Teixeira			
Directrice de Recherche,	CNRS,	Université Pierre et Marie Curie	Rapporteur
Dr. Pascal Bernard			
Directeur de Recherche,	CNRS,	ENS de Lyon	Rapporteur
Dr. Sarah Lambert			
Directrice de Recherche,	CNRS,	Université Paris-Sud	Présidente du jury
Dr. Vincent Géli			
Directeur de Recherche,	CNRS,	Université d'Aix-Marseille	Examineur
Dr. Stéphane Marcand			
Directeur de Recherche,	CEA,	Université Paris-Sud	Directeur de thèse

Remerciements

Je remercie dans un premier temps Teresa Teixeira, directrice de recherche au CNRS et Pascal Bernard, directeur de recherche au CNRS d'avoir accepté d'être les rapporteurs de mon travail de thèse.

Mes remerciements vont également à Sarah Lambert, directrice de recherche au CNRS pour avoir accepté d'être ma tutrice de thèse pendant ces quatre ans, pour ses propositions et ses conseils précieux lors de mes comités de thèse et enfin pour avoir accepté de participer à mon jury de thèse.

Je remercie également Vincent Géli, directeur de recherche au CNRS pour sa participation à mon jury de thèse et pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire, pendant environ 8 mois, lors de mon Master 2.

Je remercie également François-Xavier Barre, directeur de recherche au CNRS pour avoir participé à mes comités de thèse, qui furent à chaque fois agréables et surtout utiles.

Naturellement, je tiens à remercier chaleureusement mon directeur de thèse Stéphane Marcand pour avoir encadré mon travail pendant quatre années, pour les discussions que nous avons eues, scientifiques ou pas et pour son implication quotidienne dans ma formation.

Ce travail n'aurait pas été mené à bien sans Claire Béneut que je remercie pour son aide, ses réponses patientes à mes questions, son enthousiasme et tout un tas d'autres qualités dont faire la liste serait long et fastidieux !

Je tiens également à remercier les membres du laboratoire actuels : Sabrina Pobiega pour son aide dans les manips et sa bonne humeur, Florian Roisné-Hamelin, mon binôme de HNO (puisses-tu les garder l'an prochain !!!!), et Alice Deshayes, à qui je souhaite bon courage. J'ai également une pensée émue pour ceux qui nous ont malheureusement quittés : Kévin Jezequel et Natalja Barinova. Merci à tous de m'avoir aidé dans mon travail, et d'avoir fait en sorte que la vie au laboratoire soit agréable.

Merci à Karine Dubrana, sans qui rien n'aurait commencé, pour ses conseils, son apport scientifique permanent, et la relecture attentive de mon manuscrit.

Je remercie également Hélène Borgelet pour avoir supporté mes provocations (souvent gratuites) pendant 3 ans (et c'est pas rien) et pour nos discussions sur des sujets sociétaux divers et variés. J'ai la prétention de croire que tu vas t'ennuyer ferme, sans moi, alors qu'il te reste encore un an ! Merci également à Maoussi Lhuillier-Akakpo pour ton amitié, même si tu es partie trop tôt... Merci aussi pour cette fantastique macro image J qui m'a permis de gagner un temps fou.

Un grand merci à l'équipe du CiGex et plus particulièrement à Didier Busso et Elea Dizet pour leur aide à la création de plasmides qui furent essentiels dans la réalisation de ce travail et dont certains, encore dans les tiroirs seront essentiels aux résultats futurs.

Je remercie également l'ensemble des levuristes du bâtiment Florent Dobé, Rafael Costa, Clémentine Broca, Émilie Ma, Éric Coïc, Laurent Maloisel, Cécile Ducroc pour leur soutien.

Je remercie également Alba Cico, Amandine Batte et Marion Chalot pour le temps passé à l'organisation des Student Live Forums mensuels ! Et je souhaite à la nouvelle équipe en place de réussir à maintenir ces réunions.

J'adresse également mes remerciements à Didier, Norbert et les autres gardes de l'IRSN dont je ne connais malheureusement pas le nom mais qui se sont chaque fois empressés d'écourter leur ronde de nuit pour venir m'ouvrir quand je désirais partir tard le soir. Et je remercie particulièrement Edgar, toujours très amical.

Enfin, je remercie mes parents pour m'avoir supporté (dans tous les sens du termes), même s'il est vrai qu'ils n'avaient pas le choix !

Table des matières

Remerciements	2
Table des figures.....	6
Table des tableaux	6
Liste des abréviations :	7
Avant-Propos	9
I) Les chromosomes dicentriques.....	10
1) Formation des chromosomes dicentriques	10
2) Les chromosomes dicentriques, causes d'instabilité génétique	12
a) Ségrégation et réarrangements induits par les dicentriques	13
b) Instabilité génétique et cancers	15
3) Mécanisme de rupture des ponts d'anaphase	16
a) Chez les animaux.....	16
b) Le centromère conditionnel et l'étude des dicentriques chez <i>S. cerevisiae</i>	18
c) Dynamique des chromosomes dicentriques avant leur rupture.....	19
II) La protéine Rap1.....	20
1) Découverte et principaux rôles	20
2) Les différents domaines de Rap1 et leurs fonctions.....	22
a) Le domaine de fixation à l'ADN (DBD)	22
b) Conséquences de la structure de Rap1 et de son attachement à l'ADN	25
i) Fixation de Rap1 et réplication.....	25
ii) Réarrangement des nucléosomes	27
iii) Terminaison de la transcription.....	28
iv) Rôle aux télomères	28
c) La partie N-terminale et le BRCT	28
d) Le domaine toxique (Tox).....	29
e) Le domaine d'activation.....	29
f) Le RCT	30
III) Condensine chez <i>S. cerevisiae</i>.....	31
1) Historique et généralités	31
2) Méthodes d'étude de la condensation des chromosomes.....	35
3) Structure des Condensines et liaison à l'ADN	37
a) Structure générale des complexes SMC	37
b) Structure spécifique de Condensine.....	39
c) Fixation de Condensine à l'ADN.....	39
d) Fonctions des ATPases.....	40
e) Les régions Coiled-Coil	41
i) Les régions Coiled-coil chez les eucaryotes	41
ii) Structure de Smc chez <i>Bacillus subtilis</i>	41
4) Rôles, partenaires et fonction de Condensine	43
a) Multiples rôles de Condensine	43
b) Modèle de condensation.....	45
i) Modèle de réticulation stochastique ou random crosslinking.....	45
ii) Modèle d'extrusion de boucles	46
c) Partenaires de Condensine	49

i) Facteurs nécessaires à la condensation des chromosomes.....	49
ii) Topoisomérase II- α	49
5) Régulation des Condensines au cours du cycle cellulaire	52
a) Régulation transcriptionnelle	52
b) Modifications post-traductionnelles régulant Condensine.....	52
i) Activation de la condensation par les kinases CDK1, Cdc5 et Ipl1	52
ii) Déphosphorylation et décondensation.....	53
iii) Ubiquitination de Condensine et dynamique de fixation	54
iv) Conservation des mécanismes chez les autres eucaryotes	55
6) Condensine sur le chromosome <i>in vivo</i>.....	56
a) Sites préférentiels de fixation à l'ADN et condensation du chromosome	56
i) Recrutement de Condensine aux régions péricentromériques	56
ii) Recrutement aux autres loci	57
b) Condensine, transcription et remodelage de la chromatine	58
c) Condensine aux télomères ?	59
IV) Cytodiérèse et croissance du septum chez <i>S. cerevisiae</i>	61
1) Le rôle des septines	61
2) L'anneau d'actomyosine et la formation du septum primaire.....	62
a) Recrutement de l'anneau d'actomyosine et synthèse du septum primaire	62
b) La dépolymérisation de l'anneau d'actomyosine	63
3) Le septum secondaire	64
4) Séparation cellulaire	65
5) Le réseau de sortie mitotique.....	67
7) Un point de contrôle de l'abscission ?	68
Article :	70
<i>Strains and plasmids</i>	92
Résultats complémentaires	120
Discussion	128
Bibliographie	136

Table des figures

Figure 1. Formation d'un dicentrique par erreur de NHEJ après de multiples cassures	11
Figure 2. Deux possibilités de ségrégation des chromosomes dicentriques en mitose	13
Figure 3. Mécanisme de réarrangements du génome par Cassures-Fusions-Ponts	15
Figure 4. Exemple de retour des pôles du fuseau mitotique en cytotéière.....	20
Figure 5. Domaines de Rap1 et liaison à l'ADN	24
Figure 6. Les sites de fixation de Rap1 présentent une faible homologie entre eux	25
Figure 7. Le cycle cellulaire de <i>S. cerevisiae</i>	33
Figure 8. Les différents complexes SMC	34
Figure 9. Assemblage des protéines SMCs.....	38
Figure 10. Modèles de changement de conformation des condensines eucaryotes et des SMC de <i>B. subtilis</i>	43
Figure 11. Deux modèles pour expliquer le mécanisme de condensation de l'ADN.....	46
Figure 12. Mécanismes possible de condensation de l'ADN chez les eucaryotes et chez <i>B. subtilis</i>	48
Figure 13. Coopération entre Condensine et Top2	51
Figure 14. Régulation de Condensine au cours du cycle.....	54
Figure 15 La septation.....	66
Figure 16 Le MEN	68
Figure 17. Le point de contrôle NoCut n'est pas activé par la présence de ponts induits par des chromosomes dicentriques.....	121
Figure 18. Une perte des condensines n'induit pas NoCut	123
Figure 19. Un arrêt prolongé en phase S n'induit pas NoCut.....	125
Figure 20. Les nucléases Mus81 et Yen1 ne sont pas essentielles pour la cassure des chromosomes dicentriques	127

Table des tableaux

Tableau 1. Correspondance de nomenclature entre les protéines formant les complexes Condensine I/II chez différents organismes modèles.....	35
---	----

Liste des abréviations :

La nomenclature utilisée dans ce manuscrit sera majoritairement celle utilisée couramment chez *Saccharomyces cerevisiae*.

Les allèles dominants ou sauvages seront notés en majuscules italiques (ex : *CDC15*)

Les allèles récessifs seront notés en minuscules et italiques (ex : *cdc15-2*)

Les protéines seront notées avec une majuscule suivie de deux minuscules (ex : Cdc15)

Liste des abréviations :

ADN : Acide Désoxyribonucléique

AFM : Microscopie à force atomique (Atomic Force Microscopy)

ARNm/t/r : Acide Ribonucléique Messager/de transfert/ribosomal

ATP : Adénosine Tri-Phosphate

BFB : Cassures-Fusions-Ponts (Breakage-Fusion-Bridge)

BRCT : BRCA1-C-Terminal

DBD : Domaine de fixation à l'ADN (DNA Binding Domain)

dNTP : désoxyribonucléotides

DSB : Cassure double brin (Double Strand Break)

G4 : G Quadruplex

GFP : Protéine à fluorescence verte (Green Fluorescent Protein)

H3K4me : Méthylation de la lysine 4 de l'histone H3 (peut être mono- me, di- me2 ou tri- me3 méthylée)

Hinge : Domaine charnière des protéines SMC

HR : Recombinaison Homologue (Homologous Recombination)

kb : kilo bases

MNase : Nucléase micrococcace (Microccocal Nuclease)

MRX : Complexe Mre11-Rad50-Xrs2

NHEJ : Jonction Non Homologue des Extrémités (Non Homologous End Joining)

Noco : Nocodazole

pb : Paire de bases

pN : Pico Newtown

RCT : Rap1 C-Terminal de Rap1

rDNA : ADN Ribosomal

RMN : Résonance Magnétique Nucléaire

SMC : Maintenance Structurale des Chromosome (Structural Maintenance of Chromosome)

SPBs : Pôles du fuseau mitotique (Spinde Pole Bodies)

TG₁₋₃ : Séquences télomériques chez *S. cerevisiae* liant la protéine Rap1 constituée d'une Thymidine suivie d'une deux ou trois Guanines.

Tox : Domaine Toxique de Rap1

TPE : Effet de position aux télomères (Telomere Position Effect)

tRNA : ARN de Transfert (transfert RNA)

TSS : Site d'initiation de la transcription (Transcription Start Site)

UAS : Séquence d'activation en amont du gène (Upstream Activation Sequences)

Espèces

S. cerevisiae : *Saccharomyces cerevisiae*

S. pombe : *Schizosaccharomyces pombe*

D. melanogaster : *Drosophila melanogaster*

X. laevis : *Xenopus laevis*

H. sapiens : *Homo sapiens*

B. subtilis : *Bacillus subtilis*

Avant-Propos

Ce travail porte sur les chromosomes dicentriques (i.e. les chromosomes possédants deux centromères) et sur leur comportement en mitose. Les travaux sur les mécanismes de rupture de ces chromosomes et sur les réarrangements du génome qu'ils induisent sont relativement rares alors que leur implication dans l'oncogenèse est suspectée depuis des années (Maciejowski and de Lange, 2017).

Mon projet au laboratoire fait suite à l'article (Lopez et al. 2015) qui montre que chez *S. cerevisiae*, les chromosomes dicentriques sont cassés par la cytodierèse au niveau des régions péracentromériques et des fusions de télomères. Les mécanismes expliquant cette spécificité de rupture ainsi que ceux par lequel l'ADN peut être rompu (attaque nucléolytique, force physique, couplage des deux) n'y sont pas abordés expérimentalement. J'ai donc cherché à expliquer ces observations.

Ce travail porte donc sur l'implication dans la détermination des points préférentiels de cassure des chromosomes dicentriques, de Rap1, la principale protéine télomérique fixant l'ADN double brin et des Condensines.

Il consistera dans un premier temps en l'introduction des principaux points permettant de comprendre ce travail :

- Qu'est ce qu'un chromosome dicentrique et pourquoi faut-il les étudier ?
- Quelles sont les propriétés principales de Rap1 ?
- Quels sont les rôles de Condensine dans la condensation mitotique ?
- Quels sont les acteurs mis en jeu dans la cytodierèse et la synthèse du mur cellulaire ?

La première partie des résultats de ce travail est présentée sous la forme d'un article actuellement en révision.

Les résultats complémentaires portent sur des observations contestant l'existence du point de contrôle *NoCut* que nous avons faites en parallèle de l'étude de la rupture par la cytodierèse des ponts formés par des dicentriques et des défauts de condensation.

Ma thèse été financés par le CEA, l'ANR DICENs et par une bourse jeune chercheur de la fondation ARC pour la lutte contre le cancer.

I) Les chromosomes dicentriques

1) Formation des chromosomes dicentriques

Les chromosomes dicentriques (c-à-d les chromosomes possédants deux centromères) sont la conséquence d'une réparation erronée des chromosomes après une cassure double-brin.

Les dicentriques peuvent être formés par recombinaison homologue (HR) associée à un crossing-over en utilisant comme brin matrice de réparation une séquence homologue située sur un chromosome non-homologue.

Un événement de réplication induit par une cassure (BIR), peut également être à l'origine de leurs formations, si lors de la réparation, la séquence du chromosome matrice, copiée jusqu'à son extrémité contient un centromère.

La formation aberrante de néo-centromères épigénétiques est également une voie d'apparition de chromosomes dicentriques.

Les événements erronés de jonction non-homologue des extrémités dépendant de la ligase 4 (NHEJ) sont peu fréquents, du fait que cette voie de réparation est généralement fidèle (Bétermier et al., 2014). Cependant, la formation de deux cassures, ou plus, simultanées ou plus dans la cellule peut mener à la formation d'un chromosome acentrique et d'un dicentrique si l'événement de réparation par NHEJ est infidèle (**Figure 1**). Ainsi, la fréquence d'apparition de ces chromosomes augmente en conséquence d'une exposition croissante à des radiations ionisantes fragmentant le génome (Rayons-X, Rayons- γ) (Muller and Altenburg, 1930; Suto et al., 2013) ou des agents chimiques endommageant l'ADN. Ces réarrangements dépendent pour la majeure partie de la fonctionnalité du NHEJ (Myung et al., 2001).

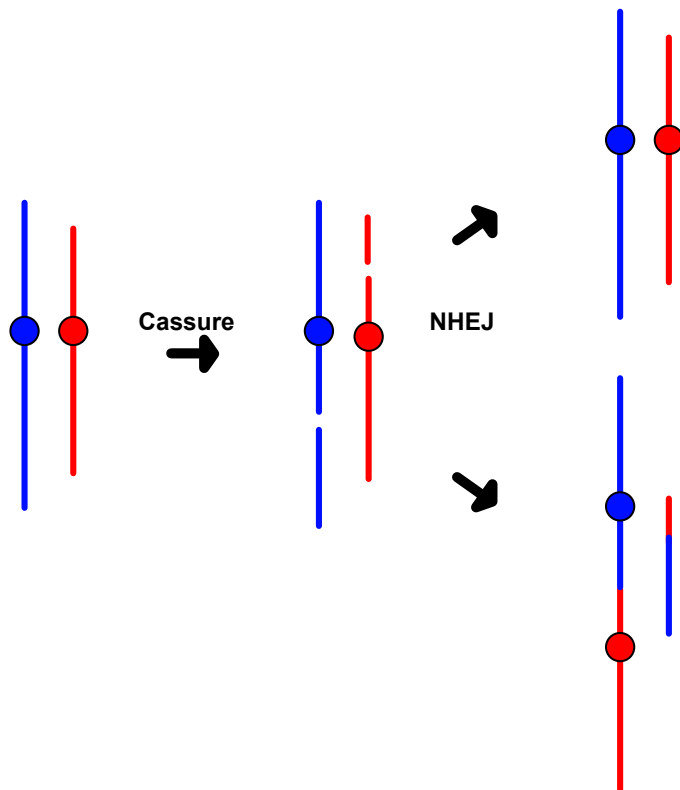


Figure 1. Formation d'un dicentrique par erreur de NHEJ après de multiples cassures

Les chromosomes (rouge et bleu) subissent une cassure simultanée. Panneau du haut : reformation des chromosomes natifs par NHEJ fidèle. Panneau du bas : formation d'un chromosome acentrique et d'un chromosome dicentrique après une erreur de NHEJ.

Dans les conditions normales, les extrémités des chromosomes linéaires ne sont pas reconnues comme des cassures double brin grâce à une structure spécialisée, le télomère.

Un des rôle de cette structure nucléoprotéique est d'inhiber le NHEJ aux extrémités chromosomiques, bloquant ainsi l'apparition de fusions chromosomiques (de Lange, 2018). Le télomère permet également l'élongation des extrémités chromosomiques, suite à leur raccourcissement inhérent aux problèmes de répllication des extrémités de la double-hélice à chaque division (Wellinger and Zakian, 2012).

Ainsi, des protéines télomériques forment des complexes dont le rôle conservé dans l'évolution est d'inhiber spécifiquement les voies de réparation aux télomères. Chez *S. cerevisiae*, il s'agit des protéines Rap1/Rif2/Sir4 (Marcand et al., 2008), chez les vertébrés ce sont certaines protéines du complexe *shelterin* (Complexe de protection des télomères) TRF2 et Rap1 (Benarroch-Popivker et al., 2016; Gaullier et al., 2016; Sarthy et al., 2009; van

Steensel et al., 1998) et chez *S. pombe* il s'agit de leurs orthologues Taz1 et Rap1 (Ferreira and Cooper, 2001; Miller et al., 2005).

Chez la levure, la télomérase est exprimée constitutivement et les télomères trop courts sont rallongés. On observe en moyenne des télomères d'environ 300 paires de bases dans une cellule sauvage. Chez les mammifères, les cellules somatiques n'expriment pas la télomérase et les télomères se raccourcissent donc au fil des divisions (Blasco, 2005). La présence de télomères trop courts induit alors les voies de signalisation des dommages de l'ADN et l'arrêt permanent du cycle cellulaire appelé sénescence (Abdallah et al., 2009; Xu et al., 2015). Il est possible de mimer ce raccourcissement constitutif chez la levure et cette sénescence en supprimant un élément essentiel de l'élongation des télomères (par exemple la télomérase) (Xu et al., 2015). La reprise du cycle dans des cellules qui passent la sénescence induit un raccourcissement des télomères trop important pour que les protéines télomériques soient liées en nombre suffisant pour les protéger. Les télomères courts entrent alors dans une phase d'instabilité que l'on appelle crise et ils peuvent fusionner pour générer des chromosomes dicentriques (Chan and Blackburn, 2003; Heacock et al., 2004; Mieczkowski et al., 2003; Pennaneach and Kolodner, 2009).

Dans ces cas, les séquences télomériques à la fusion des chromosomes sont courtes, voire inexistantes.

Une défaillance des protéines télomériques entraîne aussi l'apparition accidentelle d'une fusion dans une cellule sauvage (Miller et al., 2005; van Steensel et al., 1998). Les séquences des télomères qui ont fusionnées par NHEJ ne sont alors pas perdues et le dicentrique présente des séquences télomériques internes potentiellement longues.

Les chromosomes dicentriques sont donc des produits aberrants du dysfonctionnement de différentes voies de réparation de l'ADN. En fonction de la manière dont ils ont été générés, ils peuvent présenter des séquences télomériques internes, ou pas.

2) Les chromosomes dicentriques, causes d'instabilité génétique

L'inactivation épigénétique d'un centromère ou son éviction par un réarrangement avant la mitose permet la ségrégation normale des chromosomes fusionnés ou réarrangés (Barra and Fachinetti, 2018; Stimpson et al., 2012). Cependant, cette issue est rare et la présence d'un chromosome dicentrique est une menace pour la cellule lors de la mitose.

a) Ségrégation et réarrangements induits par les dicentriques

Les centromères sont des séquences d'ADN spécialisées, responsables de la ségrégation fidèle des chromosomes en mitose. Présents en un seul exemplaire sur chaque chromosome, ils permettent la fixation de chaque chromatide sœur à un des pôles opposés du fuseau mitotique. Ainsi, celles-ci sont réparties équitablement dans chacune des cellules filles.

La présence de deux centromères sur un même chromosome conduit, en mitose, à deux configurations équiprobables d'attachement des centromères aux pôles du fuseau mitotique i) les deux centromères d'une même chromatide sont liés au même pôle du fuseau, permettant une ségrégation normale du chromosome et un retour à la situation initiale. ii) Les pôles du fuseau mitotique capturent chacun un centromère d'une même chromatide ce qui mène à la formation de deux ponts d'anaphase (**Figure 2**) (Hill and Bloom, 1989; McClintock, 1941; Thrower and Bloom, 2001).

Ces ponts sont rompus par la cytodierèse et forment deux cassures double brin (Lopez et al., 2015).

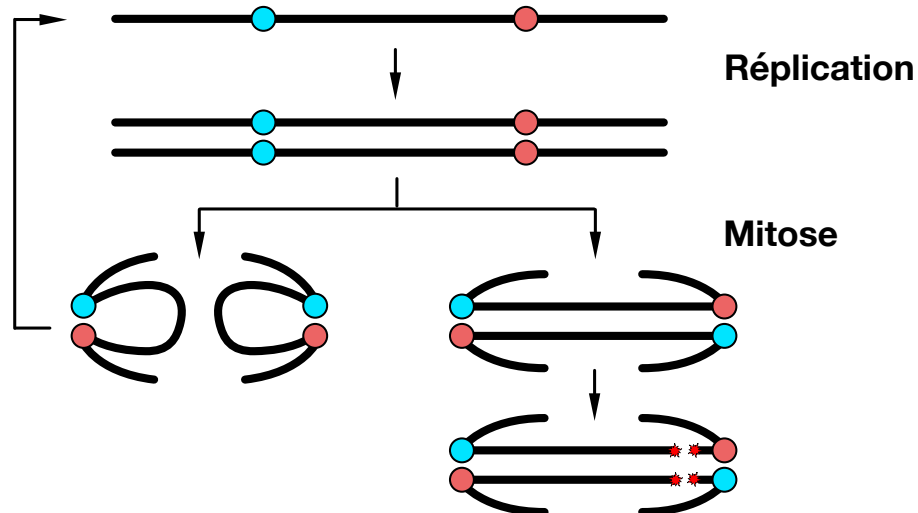


Figure 2. Deux possibilités de ségrégation des chromosomes dicentriques en mitose

Un chromosome dicentrique (centromères rouge et bleu) formé en G1 est répliqué normalement puis peut être ségrégué aléatoirement de sorte à former ou pas deux ponts d'anaphase. Les ponts chromatiniens peuvent être ultimement brisés lors de la cytodierèse ce qui mène à la génération de deux cassures double brin.

La rupture des ponts d'anaphase peut mener à plusieurs résultats i) la réparation des extrémités cassées par recombinaison (HR) en utilisant une séquence homologue comme matrice ii) la mort cellulaire causée par la perte de séquences essentielles et/ou l'absence de

réparation. iii) la stabilisation des extrémités cassées par l'ajout de télomères iv) la ligation des deux fragments par jonction directe des extrémités par NHEJ.

La réparation de ces cassures peut éventuellement être à l'origine de la régénération d'un nouveau dicentrique, qui pourra alors subir des cycles successifs de cassure et réparation, jusqu'à une stabilisation. Ce processus cyclique de cassure-fusion-ponts (BFB) a été décrit pour la première fois par Barbara McClintock (McClintock, 1941, 1942) et peut-être à l'origine de variations rapides du nombre de copies d'un gène (**Figure 3**).

En mitose, le chromosome dicentrique pourrait également être fragmenté en plusieurs segments sur une de ses portions. La réparation de ces fragments dans un ordre différent de l'ordre initial pourrait mener à une réorganisation du chromosome. Ces fragments pourraient également s'insérer dans d'autres chromosomes et mener à une réorganisation plus globale du génome. Le résultat de cette réorganisation est appelée *chromothripsis* (Ciullo et al., 2002; Gascoigne and Cheeseman, 2013; Leibowitz et al., 2015; Maciejowski and de Lange, 2017; Maciejowski et al., 2015; Marotta et al., 2013; Pennaneach and Kolodner, 2009; Sabatier et al., 2005; Selvarajah et al., 2006; Stewenius et al., 2005).

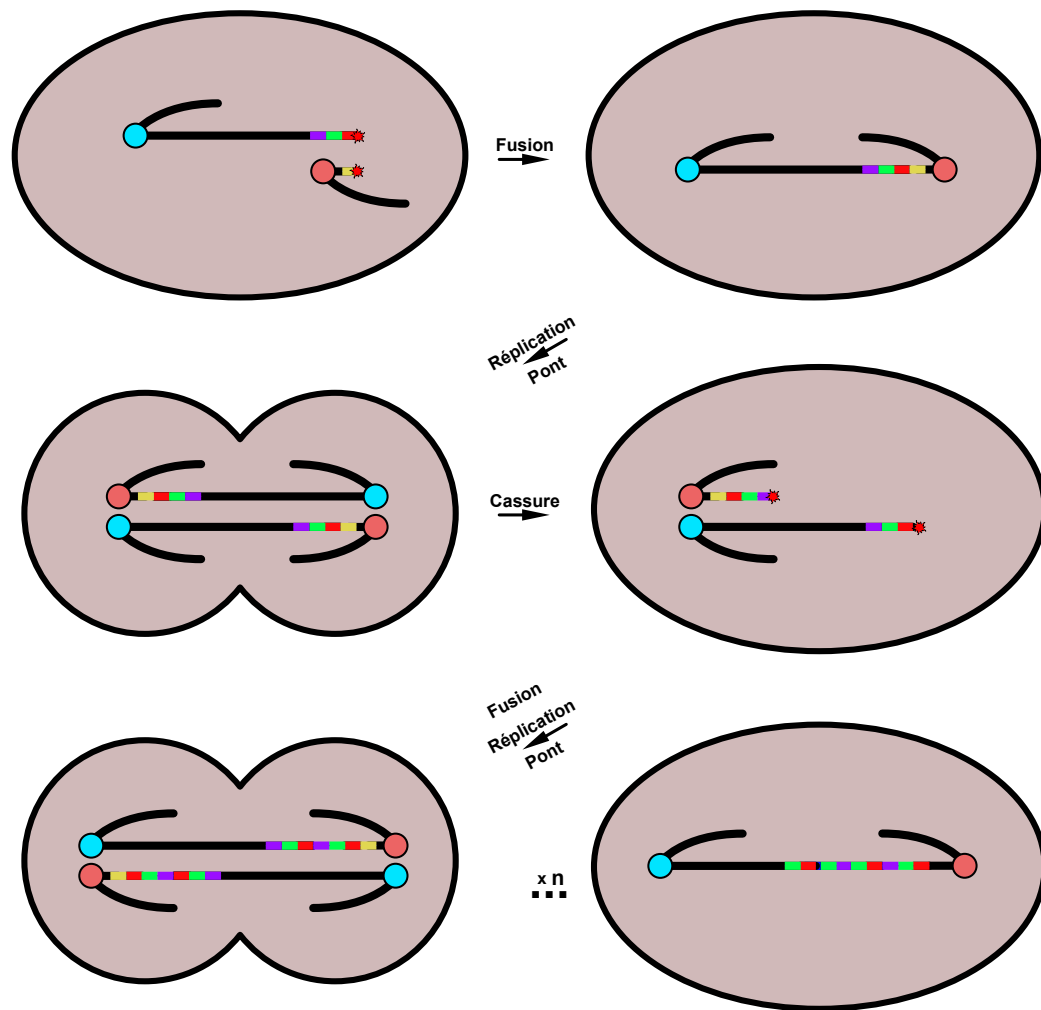


Figure 3. Mécanisme de réarrangements du génome par Cassures-Fusions-Ponts

Les extrémités générées par la cassure des deux ponts d'anaphase peuvent fusionner par NHEJ pour former un nouveau chromosome dicentrique, qui sera lui aussi cassé et refusionné à nouveau. La position de cassure sur le dicentrique détermine directement les réarrangements induits. Ceux-ci peuvent être classés en trois catégories i) Perte d'hétérozygotie (jaune) ii) translocation non-réciproque et iii) amplification génique (violet, vert et rouge). Le mécanisme de BFB est donc connu comme celui capable de générer les plus nombreux réarrangements en le nombre de cycles le plus court, depuis environs 80 ans.

b) Instabilité génétique et cancers

Du fait que les chromosomes dicentriques sont une source d'instabilité génétique, la création transitoire d'un dicentrique dans une lignée cellulaire est un vecteur de réarrangement du

caryotype. Ces réarrangements peuvent potentiellement mener à une dérégulation de l'expression génique et finalement à l'oncogenèse. La formation accidentelle d'un dicentrique pourrait donc suffire à initier un réarrangement complexe et pro-oncogénique du génome (Gascoigne and Cheeseman, 2013; Maciejowski et al., 2015).

La formation de chromosomes dicentriques chez la souris promeut l'apparition de tumeurs, dans lesquelles des traces de BFB sont visibles et peuvent concerner tous les chromosomes (Thomas et al., 2018), montrant un effet pro-oncogénique des réarrangements induits par des dicentriques.

Ainsi, en étant une source de BFB et de *chromothripsis*, les chromosomes dicentriques peuvent participer à l'initiation de la tumorigenèse, mais aussi à la génération de réarrangements massifs dans un tissu cancéreux. L'hétérogénéité caryotypique des cellules induite par ce mécanisme favorise la résistance aux drogues des tumeurs (Selvarajah et al., 2006).

Le BFB est également une source d'évolution du génome qui favorise, par exemple, l'apparition de résistances aux antifongiques chez les champignons (Croll et al., 2013).

La ségrégation des chromosomes dicentriques est donc un défi pour la cellule mitotique. Les réarrangements induits par la cassure de ces chromosomes en mitose sont responsables de dérégulation de l'expression des gènes et peuvent mener, à la mort cellulaire ou à une évolution et une adaptation au milieu.

3) Mécanisme de rupture des ponts d'anaphase

a) Chez les animaux

Le devenir des chromosomes dicentriques et la manière dont ils cassent restent peu étudiés, malgré l'importance qu'ils ont dans les processus de réarrangement de l'ADN favorisant l'oncogenèse. Cependant, des travaux relativement récents ont permis de mettre en lumière ce sujet dans différents systèmes modèles.

L'utilisation d'un dicentrique conditionnel dans les cellules DT40 de poulet a permis de montrer que la contraction de l'anneau d'actomyosine lors de la cytodierèse est nécessaire à la rupture des chromosomes dicentriques. La tension générée par l'élongation du fuseau mitotique ne suffit donc pas à casser les ponts d'anaphase (Gascoigne and Cheeseman, 2013),

en accord avec les études des propriétés biophysiques de l'ADN (Houchmandzadeh et al., 1997; Marko, 2008; Nicklas, 1983).

L'apparition de micronoyaux et de chromosomes acentriques, après ruptures de dicentriques, dépend également de la cytodièrese, dans des cellules humaines (Zhang et al., 2015). Il a ensuite été confirmé, dans des cellules HeLa présentant des fusions de chromosomes provoquées par un allèle dominant négatif de TRF2, que les ponts chromatinien formés par des dicentriques ne cassaient pas en anaphase. La rupture a lieu plus tard et est facilitée par une digestion par l'exonucléase cytoplasmique TREX1 (Maciejowski et al., 2015). Cependant, si ce mécanisme explique comment la séparation des masses nucléaires des cellules filles peut être facilitée, l'activité exonucléase de TREX1 suggèrent la formation de cassures simple-brin responsables du début de la réaction de dégradation de l'ADN constituant les ponts (Hou and Cooper, 2018; Maciejowski et al., 2015). La façon dont ces dommages simple-brin sont formés reste inconnue. De plus, le mutant de TRF2 utilisé permet de former spécifiquement des dicentriques par fusions de télomères, cependant on ne peut déterminer quels chromosomes ont fusionnés, ni leur nombre exact dans une cellule (environ 1 par cellule dans (Maciejowski et al., 2015)). Il n'est donc pas possible de faire une étude des positions où cassent les chromosomes dicentriques pour observer une spécificité de région ou de séquence.

Chez le nématode *C. elegans*, l'irradiation d'œufs formés d'une seule cellule permet la création aléatoire de dommages et la formation de ponts d'anaphase, dont certains sont des dicentriques. Il a alors été montré que, lors de la cytodièrese, l'endonucléase double brin LEM-3, est recrutée au niveau du midbody par un mécanisme dépendant de la constriction de l'anneau d'actomyosine et d'Aurora B, la kinase principale en charge de l'orientation et de la croissance du fuseau mitotique. LEM-3, mise au contact de l'ADN par l'anneau d'actomyosine digère les ponts chromatinien et permet leurs résolutions (Hong et al., 2018a, 2018b).

Les outils permettant de détecter les sites de cassure des dicentriques dans les cellules HeLa et chez *C. elegans* n'existent pas pour l'instant. La détection des positions de cassure est indirecte et réalisée après un grand nombre de cycles cellulaires. On regarde donc des clones stabilisés après un grand nombre de cycles de BFB. Il n'est donc pas possible de s'intéresser à une spécificité de cassure des dicentriques au niveau de régions préférentielles ou d'être sûr de ne regarder qu'un seul pont formé de deux chromosomes connus.

b) Le centromère conditionnel et l'étude des dicentriques chez S. cerevisiae

Un outil clef a permis l'étude des chromosomes dicentriques au cours d'un seul cycle cellulaire chez *S. cerevisiae*, le centromère conditionnel (Hill and Bloom, 1987, 1989).

Chez *S. cerevisiae*, le centromère consiste en une séquence consensus de 125 pb liant un unique microtubule via le kinétochore et l'histone centromérique (CenH3/Cse4).

Un centromère natif peut être mis sous contrôle de promoteurs forts et inductibles du gène *GAL1* (*pGAL1*). L'activation des promoteurs, par la présence de galactose, provoque une inhibition de la fonction centromérique. Le mécanisme d'inhibition est mal connu mais il passe par un décrochage du kinétochore de son attachement au centromère (Tanaka et al., 2005). Il est pour cela proposé qu'un encombrement stérique, dû au recrutement des différents complexes impliqués dans la transcription, soit responsable de ce détachement.

L'efficacité de ce système dans cet organisme vient sans doute de la force du promoteur *pGAL1* dans le recrutement de la machinerie transcriptionnelle et du faible attachement du centromère/kinétochore au SPB via un seul microtubule. Dans les autres espèces, le centromère s'étale sur quelques kb ou plus et est lié par plusieurs microtubules ce qui complexifie le détachement et l'inhibition conditionnels (Thomas et al., 2017).

L'inhibition de la fonction d'un centromère, par le galactose, permet de fusionner deux chromosomes et de les propager sous la forme d'un chromosome monocentrique conditionnel. La levée de l'inhibition du centromère par le glucose réactive rapidement sa fonction et forme un dicentrique dont on pourra observer la cassure dans environs la moitié de la population au cours de la première mitose.

L'utilisation de dicentriques conditionnels a tout d'abord mené à proposer que les chromosomes dicentriques sont cassés, en anaphase par la tension exercée par le fuseau mitotique (Thrower and Bloom, 2001).

Cependant, les chromosomes dicentriques ne sont pas rompus après un blocage en anaphase tardive, provoqué dans un mutant thermosensible (*cdc15-2*), incapable d'activer la contraction de l'anneau d'actomyosine à température restrictive (Lopez et al., 2015). Ceci montre que même en cas d'élongation maximale du fuseau, l'ADN n'est pas brisé par la tension exercée aux centromères. De plus, la relâche du cycle après un tel blocage permet d'observer la cassure des ponts formés, montrant que l'attachement centromère/kinétochore/microtubule n'a pas été rompu et que les étapes suivant l'anaphase sont celles nécessaires pour casser. Pour finir, un blocage spécifique de la cytodierèse permet d'abolir la rupture des dicentriques,

ce qui montre que la séparation physique des deux cytoplasmes est nécessaire (Lopez et al., 2015). D'autres études ont également montré que la cytodiérèse casse l'ADN non ségrégué chez *S. cerevisiae* (Amaral et al., 2016; Baxter and Diffley, 2008; Cuylen et al., 2013; Pampalona et al., 2016; Quevedo et al., 2012).

La cassure des dicentriques se fait préférentiellement au niveau de points chauds pericentromériques s'étalant sur 30 kb. Cette distance est indépendante de la longueur de l'espace intercentromérique, jusqu'à une confusion des deux points chauds de cassure (Lopez et al., 2015; Song et al., 2013). De plus, les chromosomes dicentriques formés par des fusions de télomères cassent préférentiellement au niveau de la fusion, restaurant ainsi fréquemment le caryotype et la viabilité de la lignée (Pobiega and Marcand, 2010), par un mécanisme qui reste à définir. Ce mécanisme pourrait avoir été sélectionné évolutivement comme un ultime moyen de sauvetage du caryotype après une fusion télomère-télomère.

c) Dynamique des chromosomes dicentriques avant leur rupture

Au cours de l'anaphase d'une cellule monocentrique, les deux pôles du fuseau mitotique (SPB), servant à l'organisation des microtubules sont éloignés l'un de l'autre par l'élongation du fuseau mitotique. A cette étape, les centromères sont tirés par les SPB ce qui permet la séparation des chromatides sœurs. Ils se retrouvent ainsi aux pôles opposés au site de constriction. Il peut alors sembler paradoxal qu'une cassure proche des centromères dépende de la cytodiérèse.

Au début de la cytodiérèse, les deux noyaux ne contenant que des chromosomes monocentriques sont disjoints et la dépolymérisation des microtubules ne provoque alors qu'un mouvement mineur des SPB, en direction du centre de la cellule dans laquelle ils ont été ségrégués (**Figure 4 Panneau du haut**). Ce comportement est également observé dans la moitié des cellules d'une population contenant un dicentrique, ce qui est attendu vis à vis des deux configurations que peuvent adopter ces chromosomes en mitose (Lopez et al., 2015; Thrower and Bloom, 2001) (**Figure 2**). Cependant, dans l'autre moitié de cette même population, on assiste à un retour rapide des SPB et des centromères au niveau du point d'abscission, à la fin de la contraction de l'anneau d'actomyosine ou rapidement après sa dépolymérisation (**Figure 4 Panneaux du milieu et du bas**). Ce mouvement des SPB est par ailleurs précédé par celui des centromères du dicentrique (Lopez et al., 2015; Thrower and Bloom, 2001). Ceci laisse penser que i) la région intercentromérique relie toujours les centromères et donc que le pont d'anaphase n'est pas cassé à ce stade ii) une recondensation ou un retour élastique de la chromatine pourrait diriger ce mouvement après la relâche des

forces de tension exercées par le fuseau iii) ce retour permet une cassure des dicentriques par la cytotodiérèse au niveau des régions péricentromériques.

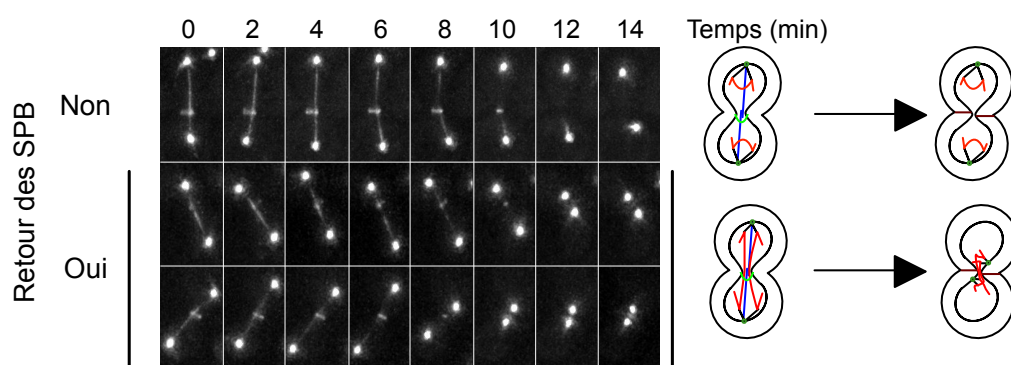


Figure 4. Exemple de retour des pôles du fuseau mitotique en cytotodiérèse

Les images sont prises sur une souche contenant un chromosome dicentrique activé en glucose. L'anneau est taggué par Myo1-GFP (schématisé par un demi-cercle vert), les microtubules par Tub1-CFP (bleus) et les pôles du fuseau par Spc42-mCherry (verts). Images issues de : (Lopez et al., 2015).

Comme mentionné plus haut, les chromosomes dicentriques formés par une fusion de télomères cassent plus fréquemment aux sites de fusion. Les fusions télomériques étant constituées d'ADN double brin, il a semblé essentiel de tester le rôle de la principale protéine liant les séquences TG₁₋₃ aux télomères : Rap1.

II) La protéine Rap1

1) Découverte et principaux rôles

Rap1 (« Repressor Activator Protein 1 ») est une protéine essentielle de *S. cerevisiae* découverte par David Shore et Kim Nasmyth en 1987 (Shore and Nasmyth, 1987). Elle est encodée par un gène présent en une seule copie et sans redondance. Ce facteur de transcription fut caractérisé pour son rôle de répresseur de la transcription des loci régulant le type sexuel, mais également pour sa fonction d'activateur de la transcription. La protéine Rap1 est ainsi impliquée dans la régulation de la transcription de 92 des 121 gènes encodant des protéines ribosomales (Rhee and Pugh, 2011) et contrôle la régulation de gènes essentiels à la glycolyse. On estime que Rap1 régule l'expression de 300 à 500 gènes en croissance

exponentielle en glucose, ce qui représente entre 5% à 10% du génome de la levure (Lieb et al., 2001; Rhee and Pugh, 2011). En l'absence de glucose, le profil de fixation de Rap1 sur l'ADN varie et on retrouve la protéine aux promoteurs de 52 gènes (Buck and Lieb, 2006) permettant ainsi aux cellules de réguler leur profil transcriptionnel et de s'adapter aux conditions de croissance et à la source de carbone. De même, Rap1 est relocalisé suite à la détection de dommages à l'ADN et permet l'activation de la transcription de *RNR3*, dont la protéine est impliquée dans le contrôle de la concentration en dNTPs dans la cellule et donc dans la réparation de l'ADN (Tomar et al., 2008). Il est également proposé que Rap1 contrôle l'expression des gènes en senescence répllicative induite par une perte de télomérase, en étant relocalisée des télomères trop courts vers les promoteurs de centaines de gènes. Rap1 réprime notamment l'expression des histones canoniques en senescence (Platt et al., 2013).

La mort rapide des cellules déplétées en Rap1 (Shore and Nasmyth, 1987) est probablement provoquée par la dérégulation globale de la transcription. Cependant, Rap1 possède également un autre rôle majeur aux télomères.

Contrairement au reste du génome où l'on ne trouve que des sites Rap1 isolés ou en cluster de deux sites espacés de 20 à 100 pb (Kubik et al., 2018; Rhee and Pugh, 2011), on estime que les séquences double brin riches en guanines des télomères (TG₁₋₃) sont couvertes, à raison d'une protéine toutes les 15-20 paires de bases environ, d'après des analyses *in vitro* (Conrad et al., 1990; Gilson et al., 1993; Ray and Runge, 1999a, 1999b). On estime donc qu'il y a entre 15 et 20 protéines Rap1 fixées en tandem, sur chacun des 32 télomères de la levure haploïde (longueur moyenne de l'ordre de 300 ± 40 pb) (Conrad et al., 1990; Förstemann et al., 2000; Wright and Zakian, 1995). Ainsi, entre 500 et 600 protéines Rap1 sont liées aux télomères ce qui correspond à 10 à 15% des 4000 à 5000 molécules estimées présentes dans une cellule (Ghaemmaghami et al., 2003). Cependant, entre 3 et 8 foyers de Rap1 par cellules sont observés, ce qui correspondent aux clusters de télomères et non à une distribution nucléaire homogène (Palladino et al., 1993; Rabl, 1887). Il est donc proposé que des interactions indépendantes de la fixation de Rap1 à l'ADN avec les protéines Sir3/4 aux télomères et subtélomères permettent de concentrer la protéine Rap1 dans ces foyers à la périphérie du noyau (Gotta et al., 1996).

Aux régions subtélomériques et aux loci impliqués dans la régulation du type sexuel *HML* et *HMR*, Rap1 recrute les protéines Sir3 et Sir4. Sir4 recrute alors l'histone déacétylase Sir2. La déacétylation des histones permet alors la propagation de Sir3 puis de Sir4 et la formation d'hétérochromatine, responsable de la répression transcriptionnelle (Gottschling et al., 1990;

Luo et al., 2002). Rap1 a donc pour rôle de créer un site de nucléation de l'hétérochromatine qui se propage ensuite sur les subtélomères en interagissant avec les histones déacétylées. Aux loci *HMR* et *HML*, Rap1 initie la propagation d'hétérochromatine de la même manière en combinaison avec deux autres facteurs Orc et Abf1 (Gartenberg and Smith, 2016). Cette hétérochromatine bloque le recrutement des ARN polymérases et réprime l'expression des gènes subtélomériques. On appelle Effet de Position aux Télomères (TPE) ou variéation cette répression transcriptionnelle aux loci proches de l'extrémité chromosomique (Cockell et al., 1995; Hecht et al., 1996; Moretti et al., 1994).

Il est proposé que la propagation de l'hétérochromatine sur le chromosome soit médié par plusieurs mécanismes :

- Sir3 est la protéine limitante du complexe Sir2/3/4. En surexpression, on remarque une propagation bien plus importante de l'hétérochromatine et du TPE sur les chromosomes (Hochoer et al., 2017; Renauld et al., 1993; Ruault et al., 2011).
- Sir3 lie plus facilement les histones hypométhylées. La méthylation de la lysine 4 de l'histone H3 (H3K4me), par la méthylase Set1, est également un régulateur de la position des complexes Sir sur le chromosome (Dehé et al., 2006; Santos-Rosa et al., 2004).

2) Les différents domaines de Rap1 et leurs fonctions

Chez la levure, Rap1 est une protéine de 827 acides aminés qui présentent cinq domaines caractérisés. En l'absence d'ADN, la protéine prend une forme d'anneau en solution et reste sous la forme de monomère (Williams et al., 2010). La partie N-terminale de la protéine n'a pas de domaine structuré prédictible à l'exception d'un domaine BRCT (BRCA1-C-Terminus) (Callebaut and Mornon, 1997; Matot et al., 2012; Zhang et al., 2011). La protéine comprend aussi un domaine d'attachement à l'ADN (DBD), un domaine Toxique (Tox), un domaine servant à la fonction d'activation de la transcription. Un domaine nécessaire à la répression de la transcription et régulant la taille des extrémités télomériques, se situe au niveau de l'extrémité C-terminale de la protéine (RCT *Rap1 C Terminal domain*) (**Figure 5**).

a) Le domaine de fixation à l'ADN (DBD)

Le domaine de liaison à l'ADN (DBD) constitue le milieu de la protéine et est essentiel à la viabilité cellulaire (Graham et al., 1999). La première étude structurale de Rap1 en

cristallographie liée à l'ADN montre que le domaine minimum du DBD (acides aminés 361-596) fixe l'ADN télomérique avec une affinité équivalente à celle de la protéine entière (König et al., 1996). Les résultats montrent également que Rap1 se fixe à l'ADN via deux homéo-domaines myb en tandem (Henry et al., 1990; Mukherjee et al., 2012) séparés par 30 acides aminés et reconnaissant chacun une portion de la séquence spécifique de Rap1. Les deux domaines myb, basés sur un motif turn-hélice-turn se fixent à l'ADN. De plus, la partie C-terminale du DBD s'enroule autour de la molécule d'ADN en interagissant avec ses deux brins de manière spécifique, assurant la stabilité de l'interaction de Rap1 avec ses sites. La partie C-terminale du DBD vient alors interagir avec la partie N-terminale pour verrouiller la fixation au site de liaison (Matot et al., 2012). Un mutant *rap1Δ591-597* forme une protéine sans la boucle du DBD possédant une affinité 5 fois plus faible que la protéine sauvage pour l'ADN. Son expression ne permet pas la viabilité des cellules (Matot et al., 2012).

La présence de deux homéo-domaines myb peut s'expliquer par le fait que les répétitions télomériques sont courtes et présentent donc une faible surface pour s'accrocher. Les deux domaines reconnaissant les mêmes séquences augmentent donc l'affinité totale de la protéine et sa probabilité de fixation (König et al., 1996) (**Figure 5**).

L'observation par microscopie à force atomique (AFM) de la fixation de protéines Rap1 en tandem sur un ADN mimant un télomère montre une rigidification des séquences au niveau des sites liant plusieurs protéines. Ceux-ci adoptent alors une forme de bâtonnets droits et ne cumulent pas la somme des torsions que l'on observe lors de la fixation d'une seule protéine Rap1 (Le Bihan et al., 2013). Cette absence d'augmentation de la torsion avec l'augmentation du nombre de sites Rap1 peut être expliquée par leur proximité, ne laissant pas place à une déformation pour cause de contrainte stérique. Cependant, la torsion de l'ADN, visible en AFM après fixation d'une seule protéine, (Gilson et al., 1993) n'a pas été confirmée par la structure cristallisée par (Le Bihan et al., 2013). Il semblerait que l'Arginine 580 qui interagit avec une cytosine ouvre et déforme légèrement la double hélice sans courber fortement l'ADN (Le Bihan et al., 2013).

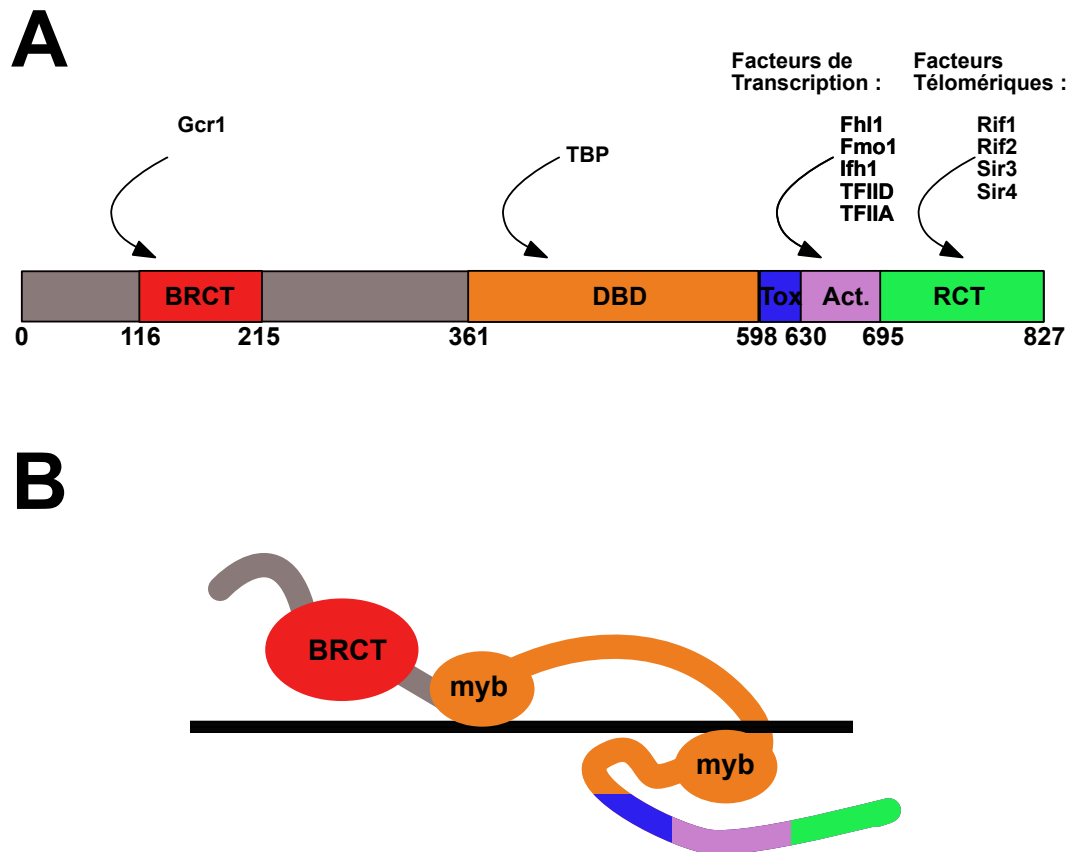


Figure 5. Domaines de Rap1 et liaison à l'ADN

En rouge : BRCT, en orange : Domaine de fixation à l'ADN, en bleu : Domaine toxique, En violet : Domaine activateur, en vert : Domaine répresseur, en gris : parties non structurées de la protéine. A) Domaines et interactants de Rap1. B) Schéma de la fixation de Rap1 à l'ADN (en noir)

La similarité de séquences des différents sites de fixation identifiés sur le génome de *S. cerevisiae* est relativement faible (**Figure 6**) en comparaison avec les autres facteurs de transcription (Rhee and Pugh, 2011). Chaque domaine myb est capable de reconnaître la séquence RRTGT espacée de trois nucléotides formant ainsi la séquence de reconnaissance RRTGTNNNRRTGT (König et al., 1996). Cependant, si aux télomères chacun des demi-sites est bien conservé du fait des répétitions TG₁₋₃, les régions promotrices présentent de fortes variations notamment sur le site de fixation du deuxième domaine myb de la protéine comme le montre une analyse sur génome entier (Rhee and Pugh, 2011). Cette hétérogénéité de séquence laisse penser que l'énergie de fixation accordée à chaque nucléotide est relativement faible. Cependant, la somme de ces énergies permet un haut niveau de spécificité et une haute

stabilité d'attachement (Rhee and Pugh, 2011). Il a par ailleurs été proposé que Rap1 puisse se lier à l'ADN via un seul domaine myb en ouvrant brièvement le « verrou » créé par le domaine C-terminal du DBD (Del Vescovo et al., 2004; Feldmann and Galletto, 2014; Feldmann et al., 2015a, 2015b). Ce mécanisme pourrait permettre à la protéine Rap1 une régulation du recrutement de ses différents cofacteurs en libérant des domaines d'interaction protéiques.

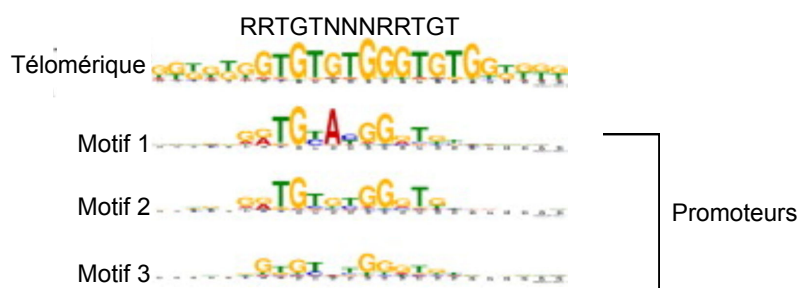


Figure 6. Les sites de fixation de Rap1 présentent une faible homologie entre eux

Représentation graphique de l'homologie entre les sites de fixation de Rap1. La prévalence des nucléotides constituant les séquences est proportionnelle à la taille de la lettre associée. La comparaison est faite avec la séquence consensus de Rap1 (séquence en noir (König et al., 1996))(Figure modifiée de Rhee and Pugh 2011).

b) Conséquences de la structure de Rap1 et de son attachement à l'ADN

i) Fixation de Rap1 et réplication

Comme dit plus haut, la protéine Rap1 est un monomère en anneau qui lie des séquences consensus peu conservée avec une forte affinité, qui peut varier légèrement en fonction des séquences.

Il a été montré qu'un motif de 14 nucléotides (GGTGT(C/A)TGGGTGTA) en tandem, espacées de 1 ou 6 nucléotides, liant Rap1 permettait de maintenir l'homéostasie des télomères d'une manière semblable aux séquences TG₁₋₃ natives. La mutation des 3G en tandem en C mène à une perte de la capacité de Rap1 à lier la séquence, corrélée à une perte de fonction (Grossi et al., 2001). Le sens des séquences, et donc le sens de la fixation de la protéine vis à vis de l'extrémité chromosomique influe peu sur la régulation de la taille des télomères (Grossi et al., 2001). Un effet de l'espacement entre les Rap1 a été proposé dans ce même article. Cependant, il semble que la perte d'affinité observée soit indépendante de l'espacement mais dépende d'une mutation de la séquence (Williams et al., 2010). De plus, il

n'y a pas de coopérativité dans la fixation des différentes molécules de Rap1 sur des sites en tandem (Williams et al., 2010) et aucune structure ne suggère d'interaction entre différentes protéines Rap1 en tandem. (Feldmann et al., 2015b).

Pour finir, une mesure des constantes d'association de différents sites consensus de Rap1 montre la très forte affinité de la protéine pour ses sites et en particulier pour les régions télomériques (entre 20 et 40 pM) (Williams et al., 2010).

La fourche de réplication est freinée aux régions télomériques (Huberman et al., 1988; Ivesa et al., 2002; Miller et al., 2006; Sfeir et al., 2009). Ces séquences riches en G pourraient former des structures (G4) ralentissant la progression de la fourche. De plus, de nombreuses protéines télomériques sont présentes car recrutées via Rap1 à ces séquences. La présence d'hélicases pour débobiner ces structures facilite le passage des ADN polymérases. En l'absence de l'hélicase Rrm3 (rDNA Recombination Mutation), on observe une pause plus fréquente de la fourche de réplication au niveau des télomères, visible en gel 2D et une accumulation des ADN polymérases pol δ et pol ϵ dans ces régions (Azvolinsky et al., 2009). De plus, l'absence de Rrm3 augmente de dix fois le temps nécessaire au passage de la fourche de réplication aux télomères comparé à un WT. La protéine Sae2 et l'hélicase Sgs1 facilitent également la réplication des télomères en résolvant les structures formées par les fourches de réplication bloquées (Hardy et al., 2014). Les problèmes de réplication télomériques se caractérisent également par une augmentation du taux de recombinaison par rapport au reste du génome (Simon et al., 2016) .

Il est difficile de démontrer formellement que Rap1 est responsable des défauts de réplication mais d'autres régions répétées du génome, comme le rDNA, lient également des protéines avec une forte affinité et présentent des problèmes de réplifications similaires, dont la résolution dépend également de Rrm3 (Torres et al., 2004).

De plus, (Goto et al., 2015) montrent qu'une protéine hétérologue possédant une haute affinité pour ses sites (lacI/lacO), fusionnée à la protéine complète Rap1 (lacI-Rap1) provoque un ralentissement du passage de la fourche de réplication. Ces constructions provoquent des cassures aux séquences lacO dans 2 % des cellules exprimant lacI-Rap1. Bien qu'un effet plus faible de la protéine lacI seule soit également constaté. Les auteurs proposent que Rap1 régule la taille des télomères, en provoquant leurs cassures lors du passage de la fourche de réplication. La fréquence des événements qu'ils observent et la capacité qu'ont certains mutants de Rap1 (*rap1-17*) à tolérer des télomères très longs (>2kb) suggèrent que ce

mécanisme n'est pas majoritaire dans la régulation de la taille des télomères. L'observation de l'effet indirect de lacI suppose également un effet de l'affinité de la protéine pour son site.

ii) Réarrangement des nucléosomes

Cette haute affinité d'association avec sa séquence pourrait permettre à la protéine Rap1 de réorganiser l'agencement des nucléosomes sur l'ADN. Rap1 lie l'ADN nucléosomal *in vitro* et *in vivo* (Koerber et al., 2009; Rossetti et al., 2001). *In vivo*, on observe que les séquences consensus de Rap1 sont appauvries en nucléosomes, ce qui laisse penser que la protéine favorise leur éviction lors de sa fixation (Hartley and Madhani, 2009; Kubik et al., 2015; Rhee and Pugh, 2011). L'expression du DBD seul suffit à l'éviction des nucléosomes. Le décrochage de la protéine restaure leur présence aux promoteurs Rap1 (Challal et al., 2018). On peut donc supposer que Rap1 et les nucléosomes entrent dans une compétition pour la liaison à l'ADN. Ce modèle n'a cependant jamais été formellement testé. La capacité d'un DBD hétérologue fixant son site avec une haute affinité à réorganiser les nucléosomes, nous renseignera sur le fait que l'affinité puisse être suffisante pour déplacer des nucléosomes, indépendamment du recrutement des co-facteurs liant le DBD de Rap1 (TBP : TATA Binding Protein). lacI de par sa très haute affinité pour lacO ($K_D = 10$ pM) et son décrochement rapide par l'IPTG se prêterait très bien à ce genre d'étude.

Rap1 et les autres facteurs de transcription partageant cette propriété (Reb1, Abf1, Tbf1) réorganisent la chromatine et modifient sa structure autour des sites d'initiation de la transcription (TSS). Ils créent ainsi des zones appauvries en nucléosomes sur lesquelles l'ARN polymérase se fixe pour commencer la transcription. Ce mécanisme empêche aussi le début de la transcription à des sites inappropriés (Challal et al., 2018; Garbett et al., 2007; Layer and Weil, 2013; Layer et al., 2010) permettant ainsi de limiter la transcription d'ARN non-fonctionnels parasites (Challal et al., 2018). Le DBD interagit également avec le facteur général de transcription TBP. Il est supposé que Rap1, en se fixant à l'ADN ouvre la chromatine et permette l'activation de la transcription de certains gènes spécifiques par TBP. Le DBD régule donc la transcription de plusieurs centaines de gènes, via sa capacité à lier un grand nombre de sites sur l'ensemble du génome (Bendjennat and Weil, 2008; Ryan et al., 2000).

iii) Terminaison de la transcription

Il a également récemment été montré que la terminaison de la transcription des ARNm dépendait de la fixation de Rap1 aux sites de terminaison. Rap1 bloquerait ainsi le passage de l'ARN polymérase II et faciliterait son détachement de l'ADN (Candelli et al., 2018).

Rap1, de part sa haute affinité serait donc capable de bloquer le passage de l'ARN polymérase via un mécanisme de barrière. Il n'est pas montré si le blocage du passage de la polymérase dépend uniquement de l'affinité du DBD pour ses séquences ou s'il nécessite le recrutement spécifique d'un facteur non identifié.

iv) Rôle aux télomères

Aux télomères, la protéine Rap1 Δ RCT, ne recrutant pas les facteurs de répression de la transcription et de la régulation de la taille des télomères, est capable de bloquer l'accès des facteurs de réparation de l'ADN. Ceci se caractérise par un blocage du complexe Mre11-Rad50-Xrs2 (MRX). Le NHEJ est alors inhibé ainsi que la résection. La fixation de Rap1 seule pourrait donc être suffisante pour empêcher le recrutement de MRX indépendamment de ses co-facteurs télomériques (Negrini et al., 2007).

En conclusion, Rap1 est donc une protéine dont le domaine de fixation possède une forte affinité pour l'ADN. Il est de plus suggéré que cette fixation suffise à déformer légèrement la double hélice. Rap1, de part sa simple fixation induit un remodelage de la chromatine et des difficultés de réplication. Elle bloque l'accès à la chromatine à d'autres protéines et est un *roadblock* probable de la RNA polymérase.

Il est envisageable que d'autres effets de la fixation de Rap1 restent inconnus et que cette protéine puisse bloquer la présence ou le déplacement d'autres complexes.

c) La partie N-terminale et le BRCT

La partie N-terminale de Rap1 n'est pas essentielle et on peut ainsi la supprimer jusqu'au 340^{ième} acide aminé sans affecter la viabilité cellulaire (Moretti et al., 1994). Le domaine BRCT de Rap1 présente moins de 19% d'identité de séquences et 43% de similarité avec les autres domaines BRCT connus (Zhang et al., 2011). Par résonance magnétique nucléaire (RMN), (Zhang et al., 2011) montrent que le BRCT de Rap1 est composé de 3 hélices alpha (Résidus 31-39, 75-81, 87-90) qui font face à un feuillet bêta de 3 « couches » (16-18, 47-48,

59-60). Le reste du domaine BRCT ne présente pas de structure secondaire précise ce qui en fait un domaine peu structuré vis à vis des autres domaines BRCT connus et lui suggère une fonction différente de la fonction établie dans la reconnaissance des protéines phosphorylées et dans l'activation des points de contrôle des dommages à l'ADN (Callebaut and Mornon, 1997; Leung and Glover, 2011).

Aucun rôle fonctionnel clair du domaine BRCT n'a été montré. Cependant, cette région interagit en double hybride avec Gcr1, un cofacteur d'activation de la transcription (Mizuno et al., 2004). L'activation transcriptionnelle de la glycolyse nécessite par exemple l'interaction entre la protéine Rap1 et son co-activateur Gcr1 et leurs liaisons aux séquences d'activation en amont des gènes (UAS). Cependant la viabilité des cellules n'est pas affectée si l'on supprime le BRCT montrant que cette interaction n'est pas essentielle à la glycolyse ou qu'elle n'est pas entièrement abolie dans un mutant du BRCT. De plus, il a récemment été montré que l'absence du domaine N-terminal de Rap1 provoquait une hyperactivation de Slt2, la principale MAPkinase responsable de la réponse aux dommages de la paroi cellulaire. Les cellules Rap1 Δ N présentent alors un mur cellulaire plus épais et une absence de séparation cellulaire menant à une agrégation (Azad et al., 2015).

d) Le domaine toxique (Tox)

La surexpression de la protéine Rap1 entière est toxique pour les cellules. Un petit domaine de 34 acides aminés (597-630) (Tox) est responsable cette toxicité. La surexpression de Rap1 sans cette région n'est plus toxique pour la cellule et son expression via le promoteur natif de Rap1 permet une croissance cellulaire normale. De plus, la surexpression de Rap1 tronquée DBD + Tox est suffisante pour inhiber la croissance des cellules. Il est proposé que cette inhibition pourrait être provoquée par une fixation aberrante de Rap1 sur des sites de faibles affinités, changeant ainsi le profil d'expression des gènes. Le domaine toxique pourrait donc avoir un rôle dans la régulation de la fixation de Rap1, en étant potentiellement la cible de modifications post-traductionnelles qui changeraient l'affinité du DBD (Freeman et al., 1995).

e) Le domaine d'activation

La fonction activatrice de Rap1 requiert le recrutement de plusieurs facteurs de transcription secondaires au niveau des promoteurs. La liaison de la protéine Rap1 à l'ADN permet au domaine activateur de recruter les cofacteurs Fhl1, Ifh1, Fmo1 nécessaires à l'activation

(Zhao et al., 2006). La synthèse d'ARN codant des protéines ribosomales est régulée par l'interaction de Rap1 avec TFIIA et TFIID (Johnson and Weil, 2017).

La liaison de Rap1 aux promoteurs permet donc le recrutement d'autres facteurs et la formation d'un précomplexe d'initiation de la transcription. De part ce rôle, la protéine Rap1 est essentielle à la cellule et la variation de son niveau d'expression a un impact direct sur la viabilité des cellules.

f) Le RCT

Le domaine responsable de la répression transcriptionnelle et également celui responsable du maintien l'homéostasie des télomères.

Le domaine C-terminal forme une structure globulaire composé de 7 hélices alpha et d'une hélice 3_{10} (Feeseer and Wolberger, 2008; Williams et al., 2010). Il a été proposé par (Feldmann et al., 2015b) que le domaine C-terminal de Rap1 soit capable d'interagir avec le DBD, stabilisant un peu plus l'interaction avec l'ADN, ce qui va à l'encontre de la structure proposée par (Matot et al., 2012). La façon dont Rap1 se fixe à l'ADN et l'implication de la partie C-terminale reste débattue.

Il interagit avec les cofacteurs télomériques Rif1, Rif2 (Rap1 Interacting Factors) (Levy and Blackburn, 2004; Wotton and Shore, 1997) et Sir3, Sir4 (Silent Information Regulator) (Feeseer and Wolberger, 2008; Gartenberg and Smith, 2016). Il a été proposé que les protéines Rif et Sir entrent en compétition au niveau des différentes molécules de Rap1 fixées aux séquences TG₁₋₃ des télomères, les Rif excluant les Sir et inversement (Buck and Shore, 1995; Feeseer and Wolberger, 2008; Palladino et al., 1993; Shi et al., 2013).

Le ciblage de la partie C-terminale de Rap1 à un télomère particulier réduit la taille de ce télomère. Cette réduction est proportionnelle au nombre de molécules recrutées montrant ainsi que la fixation de Rap1 aux télomères régule négativement leurs tailles en *cis*. Cette propriété découle d'une inhibition du recrutement de la télomérase (Kyrion et al., 1992; Levy and Blackburn, 2004; Marcand et al., 1997, 1999; Ray and Runge, 1998). Ainsi, le domaine C-terminal de Rap1 seul est suffisant pour inhiber l'élongation des télomères sur lesquels il est lié. Cette inhibition dépend du recrutement de Rif1 et Rif2, deux cofacteurs réprimant l'élongation des télomères indépendamment l'un de l'autre (Hirano et al., 2009; Negrini et al., 2007; Shi et al., 2013).

Concernant son rôle dans la protection des télomères, le RCT est impliqué dans :

- La protection des extrémités chromosomiques de la reconnaissance comme des cassures double brin par les protéines de réparation de l'ADN. Il empêche ainsi l'apparition de fusions entre chromosomes par NHEJ (Marcand et al., 2008; Pardo and Marcand, 2005). Cette inhibition du NHEJ dépend du recrutement par le RCT des cofacteurs Rif2 et Sir4 aux extrémités des chromosomes. En plus de cela, le DBD aurait par lui-même un effet inhibiteur décrit plus haut (Marcand et al., 2008).

- La protection des extrémités des chromosomes contre une attaque nucléolytique des séquences codantes par les exonucléases impliquées dans la réparation de l'ADN Exo1, Mre11 et Dna2/Sgs1. Cette inhibition dépend du recrutement de Rif2 (Bonetti et al., 2014).

Chez *S. cerevisiae*, Rap1 est indirectement responsable de l'ancrage des télomères à la membrane nucléaire tout au long du cycle cellulaire. Comme dans de nombreux organismes, les télomères sont situés à la périphérie du noyau (Rabl, 1887). Si les modalités d'ancrage des télomères à la périphérie peuvent varier au cours du cycle cellulaire, celui-ci dépend notamment d'une interaction entre le co-facteur de Rap1, Sir4, et la partie C-terminale de la protéine Esc1 (Taddei et al., 2004), ou avec la protéine membranaire essentielle Mps3 (Bupp et al., 2007) associée à la membrane interne du noyau.

En conclusion, Rap1 est une protéine essentielle pour la transcription et l'homéostasie des télomères. Elle partage sur tous ses sites la propriété de lier l'ADN avec une forte affinité, excluant les nucléosomes et créant potentiellement des problèmes de réplication du génome et des sites de fragilité. Sa fonction de *roadblocker* est suggérée dans la transcription et il est possible que Rap1 *roadblock* d'autres protéines.

III) Condensine chez *S. cerevisiae*

1) Historique et généralités

Dans les années 1880, l'observation de cellules de salamandres permit à Walther Flemming de décrire pour la première fois le cycle cellulaire. Il nomme chromatine les structures révélées par l'usage de colorants à base d'aniline (qui seront plus tard nommées chromosomes). Dans son livre « Substance cellulaire, noyau et division cellulaire », il décrit pour la première fois le comportement d'une masse chromosomique indifférenciée et homogène dans le noyau pendant la majorité du cycle cellulaire qu'il appelle « Interphase ». Il nomme également « Mitose » son individualisation en chromosomes distincts pour permettre

leur ségrégation en un nombre égal, à chaque cycle, dans les deux cellules résultantes de la division. Il distingue quatre phases de la mitose, la prophase commençant par la rupture de l'enveloppe nucléaire et le début de l'individualisation des chromosomes, la métaphase pendant laquelle les chromosomes s'alignent sur la plaque équatoriale, l'anaphase pendant laquelle les chromosomes sont ségrégés dans les cellules filles et la télophase lors de laquelle les noyaux se reconstituent, les chromosomes retournent à l'état interphasique et les cytoplasmes sont séparés (Flemming, 1882) (**Figure 7**).

La structuration du chromosome métaphasique exige plusieurs niveaux d'ordre *in vivo*. La molécule d'ADN s'enroule autour des nucléosomes, un complexe protéique formé de deux exemplaires de chaque histone canonique H3, H4, H2B et H2A pour former une structure semblable à un collier de perle. *In vitro*, un enroulement de la fibre sous la forme d'un solénoïde permet un degré supérieur de compaction sous la forme d'une fibre chromatinienne de 30 nm. Cependant, l'existence de cette fibre *in vivo* n'est pas établie (Yusuf et al., 2018). Des boucles de plusieurs kb sont également formées par un complexe appartenant à la famille des SMC (Maintenance Structurale des Chromosome) nommé Condensine pour finaliser la formation de la structure du chromosome métaphasique.

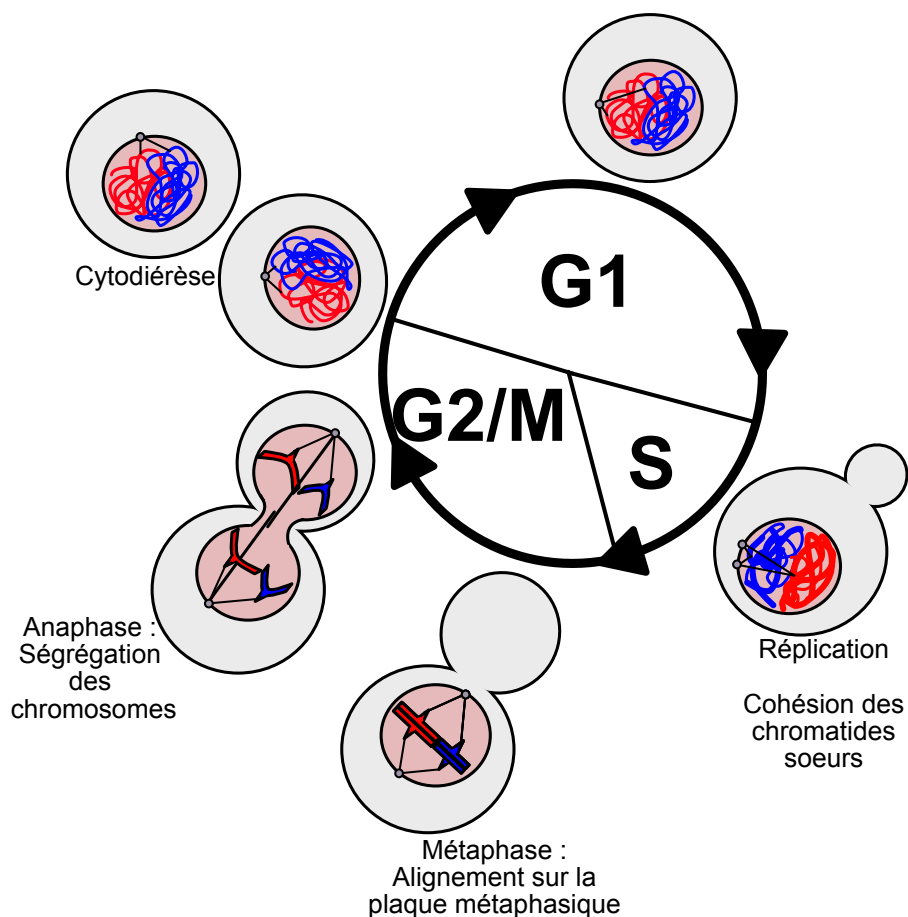


Figure 7. Le cycle cellulaire de *S. cerevisiae*

*Les cellules répliquent leurs chromosomes (bleu et rouge) en phase S pour former des chromosomes à deux chromatides. La cohésion des chromatides sœurs est maintenue par le complexe SMC Cohésine. Ces chromosomes sont condensés en métaphase sous la forme de bâtonnets. En anaphase, les deux chromatides sœurs sont ségrégés dans les cellules mère et fille et la cytodierèse en télophase permet la séparation physique des deux cytoplasmes. Deux nouvelles cellules en G1 sont alors formées. Les pôles du fuseau mitotique sont représentés par des ronds gris et sont connectés aux centromères via un attachement microtubules-kinétochores. La mitose est fermée chez *S. cerevisiae*, la membrane nucléaire n'est par conséquent jamais désagrégée.*

Historiquement, l'identification des facteurs principaux nécessaires à la condensation s'est faite biochimiquement chez *Xenopus laevis* et génétiquement chez les levures *S. pombe* et *S. cerevisiae*.

La mise en contact d'extraits mitotiques d'œufs de xénopes avec du sperme démembré permet de visualiser la condensation de l'ADN *in vitro*. Celle-ci est caractérisée par la transition de la masse de chromatine d'une forme compactée par les protéines spécifiques du sperme à un ensemble de chromatides différenciées. L'utilisation d'anticorps spécifiques permet de précipiter certaines protéines des extraits et ainsi, d'observer la condensation en l'absence de ces protéines. Il est alors possible de voir si ces protéines sont requises pour permettre la condensation des chromosomes de xénope *in vitro*. (Hirano and Mitchison, 1993; Newport and Spann, 1987).

Ces méthodes génétiques et biochimiques ont permis d'identifier deux complexes responsables de la formation des chromosomes métaphasiques : Le complexe Cohésine responsable de l'appariement des chromatides sœurs, et le complexe Condensine responsable de la condensation mitotique des chromosomes,

Un troisième membre, le complexe Smc5/6 dont le rôle reste encore mal connu joue un rôle dans la réplication notamment aux télomères et dans la ségrégation du nucléole.

Un quatrième complexe de structure semblable : MRX (Mre11-Rad50-Xrs2) impliqué dans la réparation de l'ADN et le maintien des télomères (**Figure 8**).

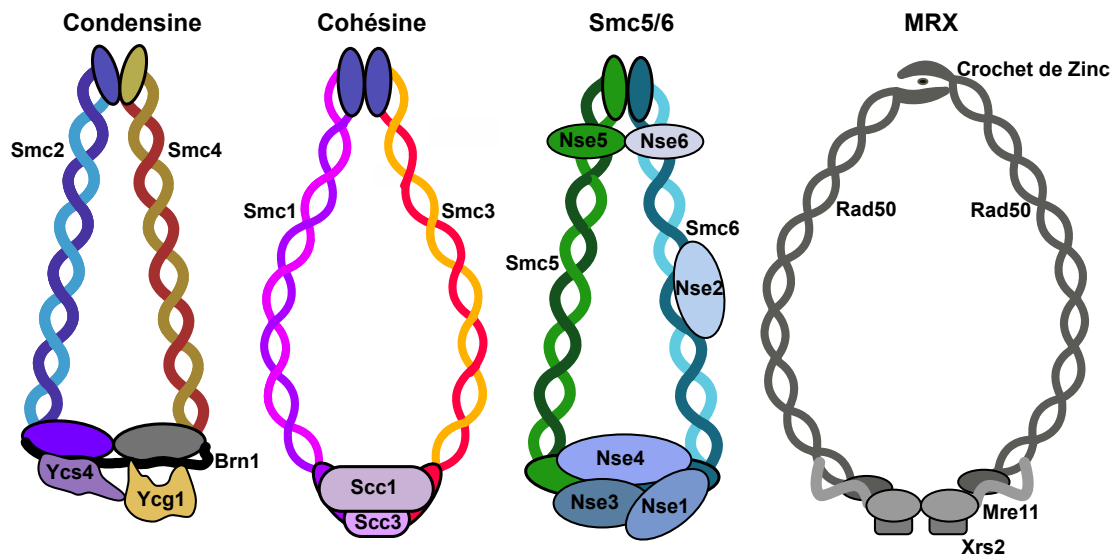


Figure 8. Les différents complexes SMC

Représentation des complexes Condensine, Cohésine, Smc5/6 et du complexe Smc-like MRX

Le premier gène requis pour la Ségrégation des Mini Chromosomes (SMC) (renommé en Maintenance Structurale des Chromosomes) a été identifié chez *S. cerevisiae* (Larionov et al., 1985) (Il s'agit de Smc1 une protéine membre du complexe Cohésine). Des membres de Condensine et Cohésine ont ensuite été identifiés chez *S. pombe* via un *screen* testant des mutants présentant un défaut de ségrégation des chromosomes menant à une cassure de l'ADN par la cytodierèse. Ainsi fut définie la famille des gènes « *CUT* » dont certains encodent des sous-unités de Condensine (Cut3 et Cut14 voir (**Table1**)) (Hirano et al., 1986). De nombreux modèles (Xénope, Souris, Cellules humaines, *Bacillus subtilis*, DT40 de poulets) ont par la suite été utilisés pour étudier et définir la condensation de l'ADN en mitose. Je me concentrerai ici majoritairement sur *S. cerevisiae* mais il sera fait mention des résultats obtenus sur d'autres organismes, qui éclairent significativement la fonction.

Les complexes Cohésine, Smc5/6 et Condensine sont essentiels. Leur inactivation provoque la mort cellulaire, souvent en un seul cycle. Les protéines formant ces complexes sont conservées en séquences et en fonctions, au niveau de domaines clefs (au moins chez les eucaryotes et nous en rediscuterons).

La nomenclature utilisée pour nommer les cinq protéines formant le complexe Condensine sera celle de *S. cerevisiae*. La correspondance avec les autres organismes est indiquée dans le (**Tableau 1**).

	Condensines				
	Sous-unités Smc		Kleisin	HEAT Proteins	
<i>S. cerevisiae</i>	Smc2	Smc4	Brn1	Ycs4	Ycg1
<i>S. pombe</i>	Cut14	Cut3	Cnd2	Cnd1	Cnd3
<i>D. melanogaster</i>	DmSmc2	DmSmc4	Barren	dCAP-D2	dCAP-G
<i>D.melanogaster II</i>	DmSmc2	DmSmc4	Cap-H2	dCAP-D3	dCAP-G2
<i>X. laevis I</i>	XCAP-E	XCAP-C	XCAP-H	XCAP-D2	XCAP-G
<i>X. laevis II</i>	XCAP-E	XCAP-C	XCAP-H2	XCAP-D3	XCAP-G2
<i>H. sapiens I</i>	hCAP-E	hCAP-C	hCAP-H	hCAP-D2	hCAP-G
<i>H. sapiens II</i>	hCAP-E	hCAP-C	hCAP-H2	hCAP-D3	hCAP-G2

Tableau 1. Correspondance de nomenclature entre les protéines formant les complexes Condensine I/II chez différents organismes modèles

2) Méthodes d'étude de la condensation des chromosomes

Chez *S. cerevisiae*, la petite taille des chromosomes et des cellules (4 à 5 µm), ainsi que la mitose fermée ne permettent pas la visualisation de chromosomes métaphasiques individualisés. Les études de condensation de la chromatine sont donc majoritairement faites de manière indirecte et restreintes à certaines régions du génome. Chez la levure, la majorité des études ont été faites après blocage des cellules en métaphase, via l'utilisation d'une drogue toxique pour les microtubules, le Nocodazole ou dans un mutant du cycle cellulaire (*cdc20*) :

I) Par Hybridation In Situ en Fluorescence (FISH) sur l'ADN ribosomal (rDNA) (Guacci et al., 1994).

Le rDNA est une séquence particulière du chromosome XII de *S. cerevisiae* encodant les ARNs formant les ribosomes. Il est constitué d'un tandem de 100 à 200 copies de 9,1 kb chacun. Chaque répétition porte 2 gènes *RDN1* et *RDN2*. Les répétitions sont séparées par des

séquences *NTS1* et *NTS2*. Au total, il y a entre 1 et 2 Mégabases de rDNA dans la levure, faisant ainsi du bras droit du chromosome 12 (12R), le plus long chez *S. cerevisiae* et formant une structure particulière dans le noyau, le nucléole (Petes, 1979). Sa condensation a lieu en fin de métaphase. En métaphase, un marquage du rDNA montre qu'il adopte une structure en boucle (*loop*) lorsqu'il est condensé par Condensine. Le rDNA adopte une structure dite en nuage (*Puff*) lorsqu'il est décondensé en phase G1/S ou dans un mutant de condensation.

II) Par la mesure de la distance moyenne entre deux loci d'un chromosome fixant des protéines hétérologues tagguées avec un fluorophore (Guacci et al. 1994) :

La distance moyenne entre deux séquences, d'un même chromosome est divisée par approximativement deux dans une cellule en métaphase comparée à une G1. On considère donc que le degré de condensation de l'ADN chez la levure est deux. Ceci a laissé penser que la condensation chez *S. cerevisiae* a un effet assez mineur bien qu'essentiel sur la structure du chromosome en comparaison à ce qui est observable chez les mammifères. Cependant, par la même méthode on observe un ratio de 5 à 10 dans ces cellules. Le remodelage qui affecte les cellules animales semble pourtant bien plus drastique. Ceci laisse penser que même si cette méthode permet d'observer qualitativement la condensation, elle pourrait être peu quantitative.

III) Par capture de la conformation des chromosomes en haute résolution (Hi-C) (Lazar-Stefanita et al., 2017; Schalbetter et al., 2017) :

Des cartes de capture de la conformation des chromosomes (Hi-C) ont été faites à chaque phase du cycle cellulaire. Elles ont permis de montrer que la condensation chez la levure est maximale en toute fin d'anaphase (Lazar-Stefanita et al., 2017). Il est donc possible que les études précédentes, faites en métaphase sous-estiment le degré de compaction chez la levure. On observe sur ces cartes une réorganisation globale de la chromatine dans le noyau entre l'interphase, pendant laquelle les chromosomes sont décondensés et la mitose, durant laquelle le rDNA est isolé du reste du génome. De plus, le génome de la levure est organisé de sorte à ce que les centromères soient regroupés au niveau du SPB. L'isolation relative des centromères par rapport au reste du génome augmente au cours de la mitose et dépend des Condensines (Lazar-Stefanita et al., 2017; Rabl, 1887).

Les mécanismes par lesquels les complexes Smc agissent restent, malgré 136 ans de recherches largement incompris, cependant l'étude de leurs structures a permis de récents progrès sur la compréhension de la fonction de condensation par Condensine.

3) Structure des Condensines et liaison à l'ADN

Les complexes Smc ont la particularité d'adopter une forme d'anneau. Ils sont composés d'un homo- ou d'un hétéro- dimère de protéines Smc auxquels sont liées des protéines non Smc variables en fonction des espèces et du complexe considéré (**Figure 8, Table1**).

a) Structure générale des complexes SMC

Les anneaux formés par les complexes Smc sont tripartites. Ils sont formés de longues protéines Smc, elles même composées de deux régions *coiled-coil* séparées par un domaine central nommé « charnière » (*hinge*). Ces *coiled-coil* s'achèvent à leur deuxième extrémité par un domaine *Walker A* en N-terminal ou *Walker B* en C-terminal. Les deux domaines *coiled-coil* de chaque Smc sont enroulés l'un autour de l'autre comme représenté (**Figure 9**) et les domaines *Walkers* s'associent pour former une tête capable d'hydrolyser l'ATP (domaines ATPases) (Hirano, 2005). Deux protéines Smc s'associent sous la forme d'un hétérodimère (Condensine : Smc2/4, Cohésine : Smc1/3) par leurs parties charnières. Les deux protéines associées forment alors un complexe en forme de « V ». Une protéine non Smc nommée *kleisin* (du grec ancien *Kleisimo* signifiant fermeture), Brn1 pour Condensine, Scc1 pour Cohésine ou Nse4 pour Smc5/6 referme l'anneau en liant les deux protéines Smc (Nasmyth and Haering, 2005). Des protéines accessoires spécifiques de chaque complexe sont alors recrutées par la *kleisin* pour permettre l'activation et la régulation des activités des complexes (**Figure 9**). Les deux têtes ATPases d'un complexe Smc n'interagissent entre elles que lors de la fixation de deux molécules d'ATP sur des sites se situant à l'interface d'interaction. L'hydrolyse de l'ATP provoque la séparation des têtes (**Figure 9**).

Nous savons aujourd'hui qu'au moins deux des trois complexes Smc, Condensine et Cohésine sont capables de former des boucles de chromatine en mitose et en interphase respectivement. La transition entre les deux se fait lors de la transition métaphase-anaphase chez *S. cerevisiae*. Nous nous intéresserons ici, plus spécifiquement au complexe Condensine et à la manière dont il forme des boucles permettant la condensation de l'ADN en mitose.

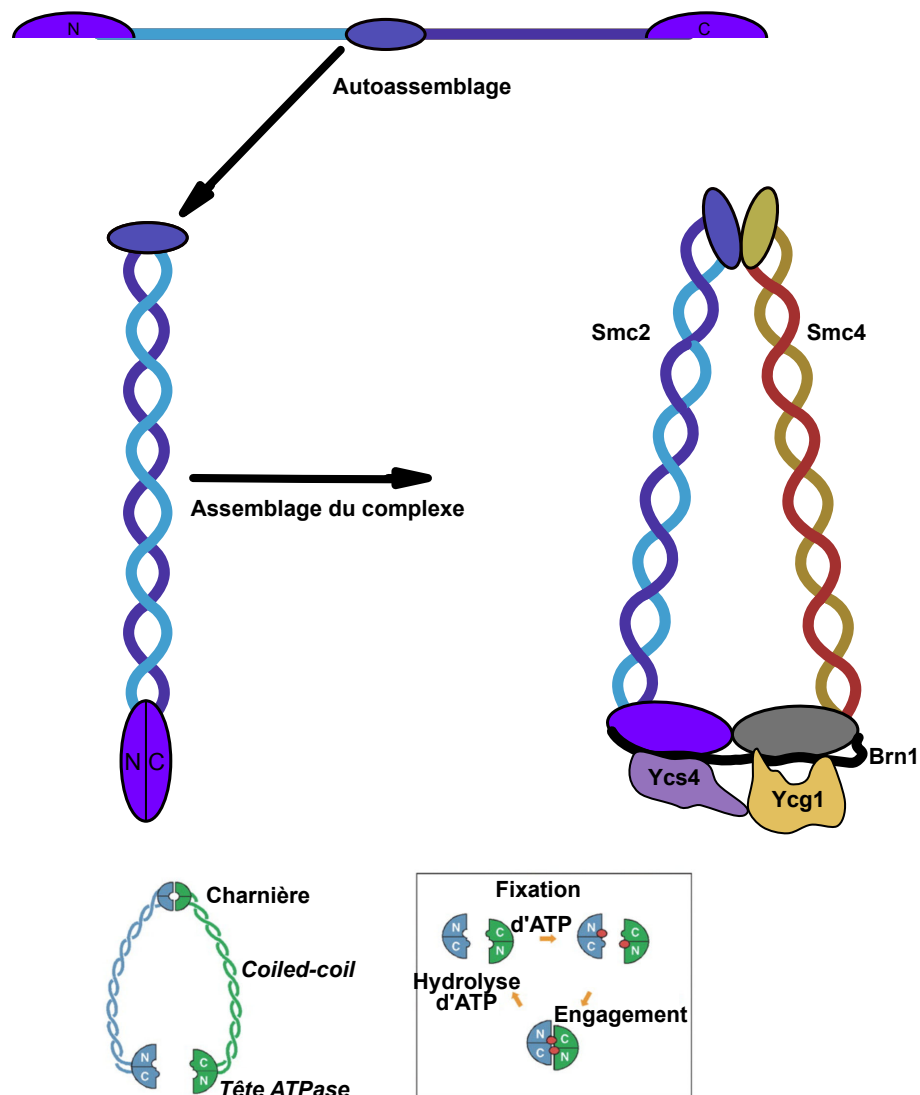


Figure 9. Assemblage des protéines SMCs

Les domaines N- et C- terminaux de chaque protéine s'assemblent entre eux alors que les deux domaines coiled-coil de part et d'autre du hinge s'enroulent et forment une structure hélicoïdale. Un hétérodimère de Smc est alors réuni par interaction entre les parties charnières prenant la forme d'un V. La kleisin (Brn1) ferme l'anneau et les protéines auxiliaires du complexe sont alors recrutées (Ycs4 et Ycg1).

L'interaction entre les sites ATPases des deux protéines Smc ne peut se faire qu'après liaison de ces sites par 2 ATPs. L'hydrolyse des molécules d'ATP conduit à la séparation des têtes ATPase et au recommencement du cycle (Losada and Hirano, 2005)

b) Structure spécifique de Condensine

Dans tous les organismes, Condensine est un complexe de cinq protéines dont chacune est essentielle à son fonctionnement (Bhalla et al., 2002; Biggins et al., 2001; Freeman et al., 2000; Lavoie et al., 2000, 2002; Ouspenski et al., 2000; Saka et al., 1994; Strunnikov et al., 1995). Les deux protéines Smc conservées, Smc2 et Smc4 et trois protéines auxiliaires sont associées comme montré (**Figure 9, Table 1**). La longueur estimée entre le *hinge* et les têtes ATPase est d'environ 50 nm. Chez *S. cerevisiae*, la *kleisin* Brn1 referme l'anneau. Les protéines auxiliaires possédant des motifs HEAT (Huntingtin Elongation Factor 3-protein phosphatase 2A-TOR1) Ycs4 et Ycg1 s'associent à Brn1 pour former le complexe actif.

Chez certains eucaryotes, il existe deux types de complexes Condensine, Condensine I et Condensine II, tous deux essentiels. Ils se différencient par leur sous-unité *kleisin* et leurs sous-unités régulatrices, comme mentionné (**Table 1**). Chez *S. cerevisiae* et *S. pombe*, il n'existe qu'un seul type de Condensine qui est l'équivalent fonctionnel de Condensine I. Des études phylogéniques suggèrent néanmoins que deux complexes existaient initialement chez l'ancêtre commun aux eucaryotes (LECA) mais auraient été indépendamment perdus plusieurs fois lors de l'évolution (Hirano, 2016).

L'activité ATPase des deux têtes formées par Smc2 et Smc4 est régulée par les sous-unités non Smc (Piazza et al., 2014). Cette activité est nécessaire pour condenser la chromatine *in vivo* (Palou et al., 2018; Thadani et al., 2018). L'activité ATPase n'est cependant pas requise pour la fixation de Condensine à l'ADN, ni *in vitro* (Kimura and Hirano, 1997; Kinoshita et al., 2015; Kschonsak et al., 2017; Shintomi et al., 2015; Strick et al., 2004) ni *in vivo* dans des cellules DT40 (Hudson et al., 2003).

c) Fixation de Condensine à l'ADN

La récente purification du complexe actif de Condensine de *S. cerevisiae* a permis la résolution de la structure de certaines parties du complexe incluant un site de fixation à l'ADN. L'étude de la structure des sous-unités *kleisin* (Brn1) et HEAT (Ycg1) montre que le complexe Condensine se fixe à l'ADN, au moins en partie, via l'enfermement des brins dans une poche formée par ces deux sous-unités. Cette poche étant trop petite pour laisser passer les nucléosomes, elle suggère un attachement fixe de cette partie du complexe à l'ADN, médié par des interactions électrostatiques. Cet accrochage a été appelé en « ceinture de sécurité » et serait inamovible à partir du moment où Condensine est chargé sur l'ADN. La

fixation à l'ADN de Brn1/Ycg1 est promotrice de l'activité ATPase de Smc2 et Smc4 (Kschonsak et al., 2017) et potentiellement de l'activité de condensation (Ganji et al., 2018). Cependant, si cette structure décrit la manière dont Condensine peut se lier à l'ADN elle ne permet pas d'affirmer que la liaison est seulement dépendante de cette partie du complexe. Une interaction entre l'ADN et Ycs4 même si elle est faible *in vitro* (Kinoshita et al., 2015; Kschonsak et al., 2017) ou avec le *hinge* ne peuvent être exclues. La liaison du *hinge* à l'ADN est soumise à débat chez les eucaryotes. S'il est admis que cette région fixe l'ADN simple-brin chez la souris et *S. cerevisiae* (Griese et al., 2010; Piazza et al., 2014), seule l'étude menée par (Soh et al., 2015) montre une capacité de fixation du *hinge* sur l'ADN double brin chez *S. cerevisiae* et *B. subtilis* ($K_D \approx 50$ nM). La cristallisation de la structure suggère également la présence d'un site chargé positivement au sommet du *hinge* de Condensine, capable de fixer l'ADN (Soh et al., 2015).

L'ouverture artificielle de l'anneau par une protidase (TEV), ou la rupture de chromosomes circulaires auxquels Condensine était lié entraînent une perte de la fixation à l'ADN et une décondensation *in vivo*. Ceci suggère que Condensine est capable d'encercler l'ADN grâce à son anneau (Cuylen et al., 2011).

Condensine interagit donc avec l'ADN via au moins deux points, la poche Ycg1/Brn1 et au locus encerclé.

Condensine est un complexe protéique en anneau qui doit interagir avec au moins deux loci distants d'un même chromosome, pour former une boucle, nécessaire à la compaction des chromosomes. Le blocage de la fixation d'un des sites d'interaction de Condensine avec l'ADN pourrait suffire à empêcher la formation d'une boucle.

d) Fonctions des ATPases

En plus de sa possibilité de fixation à l'ADN, l'activité ATPase de Condensine est essentielle pour la condensation de la chromatine (Palou et al., 2018; Thadani et al., 2018). Cette fonction ATPase est conservée dans l'évolution. Par ailleurs, on observe une co-évolution des sites ATPases mais aussi des protéines régulatrices du complexe pour permettre un maintien de son activité (Cobbe and Heck, 2006).

Chez la levure *S. cerevisiae*, les mutations effectuées dans le domaine ATPase des protéines Smc4 et Smc2 mènent à une réduction de la condensation du rDNA dans les deux cas et une perte de la viabilité (Thadani and Uhlmann, 2015). Certains mutants présentent également une

diminution du nombre de copies du rDNA, possiblement provoquée par une sélection dans la population ou une recombinaison induite par un défaut de condensation (Palou et al., 2018).

Dans des cellules humaines, il a été suggéré que les deux sites ATPases n'ont pas le même rôle dans la formation de boucles. La mutation du site de la protéine Smc2 diminue drastiquement l'activité ATPase ainsi que sa faculté à condenser l'ADN. Au contraire, la mutation du site ATPase de Smc4 ne réduit que modérément la capacité totale du complexe Condensine à hydrolyser l'ATP. De manière inattendue, la mutation du site faiblement actif (Smc4) augmenterait la condensation des chromosomes.

Ceci suggère que le site hyperactif de Smc2 dirige la formation des boucles d'ADN alors que le second site (de Smc4) a une activité de régulation. Cette observation est valable pour les deux types de Condensines I et II et pourrait s'appliquer à tous types de Smc (Elbatsh et al., 2017).

La fonction ATPase de Condensine est essentielle à l'activité de condensation de l'ADN par le complexe. Les mécanismes par lesquels cette activité promeut la condensation restent mystérieux.

e) Les régions Coiled-Coil

i) Les régions Coiled-coil chez les eucaryotes

Une étude en AFM montre que le dimère Smc2/4 isolé du complexe Condensine mis en solution adopte différentes conformations qui varient au cours du temps, indépendamment de la présence d'ATP, ce qui laisse penser que les parties *coiled-coil* des protéines Smc des eucaryotes sont flexibles. Le complexe passerait successivement d'une conformation dites en « O » (*hinge* et têtes ATPases éloignées) à une conformation en « B » (*hinge* et têtes ATPases rapprochées) (Eeftens et al., 2016) (**Figure 10 panneau du haut**). Il est possible que ce changement de conformation participe à l'activité de condensation de l'ADN par Condensine.

*ii) Structure de Smc chez *Bacillus subtilis**

Bacillus subtilis est un procaryote qui ne possède qu'un seul type de Smc (Scp-AB). De structure similaire, aux SMC des eucaryotes, le complexe est composé d'un homodimère de Smc fermé par la *kleisin* Scp-A. La sous unité Scp-B est une sous-unité régulatrice de type Kite (*Kleisin interacting winged-helix tandem element*) (Wells et al., 2017). Chez les procaryotes, la réplication et la ségrégation sont concomitantes, Scp-AB maintien donc la

cohésion entre les deux côtés opposés du chromosome circulaire avant la réplication puis la condensation au sein de chacun des deux chromosomes générés post-réplication. Ainsi le complexe joue à la fois un rôle de Cohésine et de Condensine.

Les seules études structurales des régions *coiled-coil* des complexes SMC ont été réalisées chez *B. subtilis*. Contrairement à ce qui est décrit par AFM sur une Condensine eucaryote (Eeftens et al., 2016), il semble que les bras du complexe soient rigides et ne permettent pas le passage de la conformation en « A » à celle en « B ». Une forme en « I » est cependant visible en microscopie électronique (**Figure 10 panneau du bas**) (Diebold-Durand et al., 2017; Soh et al., 2015).

Il a été supposé que les régions *coiled-coil* pouvait n'avoir qu'un simple rôle de liaison entre la charnière du complexe et les têtes ATPases. Comme décrits plus haut, ces domaines s'enroulent l'un autour de l'autre de chaque côté du *hinge* et forment une hélice. Aux extrémités les parties N-terminale et C-terminale s'assemblent pour former des têtes ATPase. Des complexes ont été créés chez la bactérie dans lesquels la longueur des bras *coiled-coil* a été modifiée. Si le retrait ou l'ajout de la partie *coiled-coil* correspond à un tour d'hélice complet des bras des protéines SMC alors, ni l'activité ATPase *in vitro* ni la viabilité des souches ne sont modifiées significativement. Néanmoins, un changement de longueur n'aboutissant pas à un tour complet de l'hélice déstructure l'agencement du complexe. Cette déstructuration ne permet pas l'activité de condensation de l'ADN par la protéine, malgré une conservation de sa capacité à hydrolyser l'ATP. Ceci montre que la structure des *coiled-coil* de *B. subtilis* n'est pas flexible en torsion. Ceci suggère également que les régions *coiled-coil* sont des unités fonctionnelles et que leur déstructuration nuit à la capacité de conversion de l'hydrolyse de l'ATP en une activité de condensation. Ces domaines pourraient ainsi être responsables de la transmission d'une force au sein du complexe permettant de convertir l'activité ATPase en activité de condensation (Bürmann et al., 2017; Diebold-Durand et al., 2017).

Chez *B. subtilis*, Scp-AB lie l'ADN double brin par le *hinge*, *in vitro* (Kumar et al., 2017).

Le modèle de capture de l'ADN par Spc-AB suggère donc que les régions *coiled-coil* sont maintenues proches l'une de l'autre en l'absence d'ADN et d'ATP adoptant ainsi la forme en « I ». La fixation d'ATP provoquerait l'ouverture de la molécule et un passage à la forme « A ». Ce changement créerait un espace entre les deux bras du complexe permettant le passage de l'ADN et la libération du site de fixation au *hinge* (Soh et al., 2015).

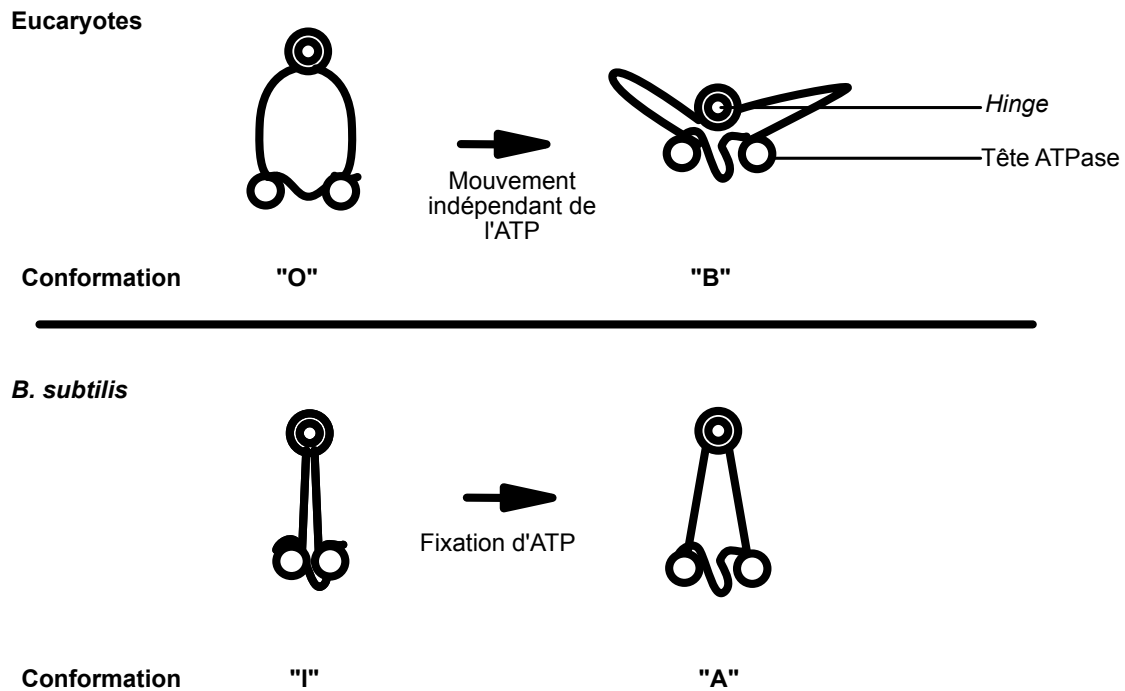


Figure 10. Modèles de changement de conformation des condensines eucaryotes et des Smc de *B. subtilis*

Panneau du haut : Schéma représentant les changements de conformation chez l'eucaryote. La conformation en « O » à gauche peut passer en conformation « B » à droite indépendamment de la fixation d'ATP. Panneaux du bas : Schéma chez *B. subtilis*. Le passage de la conformation en « I » vers celle en « A » se fait après fixation d'ATP. Seules les deux protéines Smc et la kleisin sont représentées.

4) Rôles, partenaires et fonction de Condensine

a) Multiples rôles de Condensine

Condensine est une enzyme. Sa principale activité est de promouvoir la condensation de la chromatine en mitose. *In vitro* et en présence d'ATP, il a tout d'abord été montré que Condensine provoquait l'apparition de surenroulements de l'ADN (Kimura and Hirano, 1997). Cependant, les analyses plus récentes montrent qu'*in vivo*, l'activité de condensation correspond à la formation de boucles de chromatine maintenues à leurs bases par Condensine (Cuylen et al., 2011; Ganji et al., 2018; Gibcus et al., 2018). De plus, Condensine est responsable de leur maintien tout au long de la phase M (Cuylen et al., 2011; Lavoie et al., 2002). La condensation d'un chromosome est la conséquence de la formation de multiples boucles au sein d'un même chromosome.

La somme des boucles formées par les nombreux complexes Condensines réduit la distance physique entre les extrémités des chromosomes, les faisant ressembler à des bâtonnets (que l'on peut observer en métaphase/anaphase dans les cellules de grandes tailles). La perte d'intégrité de l'anneau entraîne la libération de l'ADN, la perte des boucles et la formation de ponts d'anaphase. (Cuylen et al., 2011).

En plus de son rôle mitotique, Condensine a un rôle d'organisation du noyau en interphase notamment dans le rassemblement physique des tRNA au sein du noyau (Haeusler et al., 2008) et dans la maintenance du nombre de copies du rDNA possiblement en stimulant sa recombinaison (Johzuka and Horiuchi, 2009; Palou et al., 2018). Chez *S. pombe*, Condensine pourrait chasser RPA de l'ADN simple brin pour favoriser la réparation (Akai et al., 2011). Chez *C. elegans*, il aide à la régulation de l'expression des chromosomes X (Crane et al., 2015). Il participe à l'organisation des chromosomes méiotiques et à leur ségrégation (Hirano, 2005).

Du fait de la capacité de Condensine à créer des boucles de chromatine et ainsi, à pouvoir faire varier les interactions intrachromosomiques, il lui a été supposé un rôle dans le contrôle de la transcription (Bhalla et al., 2002; Swygert et al., 2018). Cependant, des études récentes montrent que l'inactivation des Condensines n'induit aucun changement transcriptionnel (Hocquet et al., 2018; Paul et al., 2018). Plus encore, les variations des quantités d'ARN observées dans les mutants de condensation découlent d'une ségrégation anormale de l'exosome et de la formation de ponts d'anaphase provoquées par la décondensation. Ceux-ci sont clivés au cours de la cytodierèse. Ainsi, ce qui était interprété comme des variations de la transcription n'était qu'un effet indirect de l'instabilité génétique que cette mauvaise ségrégation induit (Hocquet et al., 2018).

Chez *S. cerevisiae*, la majorité des complexes Cohésine sont clivés par les séparases lors de la transition métaphase/anaphase. Cependant, certains complexes Cohésine subsistent et peuvent entraîner la non-disjonction des bras des longs chromosomes. Condensine a pour rôle d'éliminer ces restes de cohésion au cours de l'anaphase. En réduisant la taille des bras de chromosomes, Condensine permet de transmettre la force de traction exercée par le fuseau mitotique sur les Cohésines encore présentes (Renshaw et al., 2010). Cette force exposerait les dernières molécules de Cohésine et faciliterait leur clivage par les séparases. Il est également possible qu'une partie du retrait des Cohésines se fassent mécaniquement (Renshaw et al., 2010).

De plus, la condensation d'un chromosome tend à le rendre plus rigide. Cette rigidification pourrait permettre la génération d'une force de Condensation qui s'ajouterait à celle du fuseau (Marko et al., 2018a; Ribeiro et al., 2009).

Les Condensines sont donc capables de transmettre ou de générer une force de traction lors de l'anaphase.

b) Modèle de condensation

Pour expliquer la manière dont Condensine prend en charge l'ADN ou la chromatine pour former des boucles, deux modèles principaux sont proposés :

i) Modèle de réticulation stochastique ou random crosslinking

Dans le premier modèle proposé, Condensine serait capable de s'ouvrir et de se refermer ou de s'assembler au niveau de deux molécules d'ADN, pour les encercler aléatoirement, ou pour se fixer à une molécule et en encercler une seconde, après son activation (Cuylen et al., 2011; Thadani et al., 2018). Ceci serait permis par le recrutement de Condensine en des loci particuliers du génome identifiés comme : les centromères, les promoteurs de tRNA et les promoteurs de protéines ribosomales (D'Ambrosio et al. 2008). Cependant, bien que l'abondance de Condensine aux centromères à partir de la fin de la phase S soit une observation largement reproduite, elle est plus controversée aux promoteurs (de los Santos-Velázquez et al., 2017; Thadani et al., 2018).

Un modèle biophysique a par la suite été proposé pour tenter d'expliquer comment les différents chromosomes peuvent s'individualiser dans ces conditions. (Cheng et al., 2015) propose que bien qu'aléatoire, l'attachement des Condensines à deux molécules d'ADN se ferait préférentiellement avec un brin d'ADN proche, favorisant ainsi des contacts au sein de la même chromatide. De plus, la fixation de Condensine sur l'ADN ne serait que transitoire, forçant des cycles de décrochage/raccrochage. Au début de la réaction, il serait donc possible pour un complexe d'accrocher deux brins issus de deux chromosomes. Néanmoins par biais d'accrochements/décrochements successifs, et donc de rapprochement progressif des différents loci d'une même chromatide, le système tendrait à capturer de plus en plus de fois la même molécule d'ADN. Ceci augmenterait ainsi la condensation et individualiserait progressivement les chromosomes pour en arriver ainsi à une séparation parfaite sans intra-liaison résiduelle (**Figure 11 panneaux du haut**).

ii) Modèle d'extrusion de boucles

Le second modèle consiste en l'attachement d'un complexe SMC en un point du génome et en sa possibilité d'extruder une boucle de manière ATP dépendante (Goloborodko et al., 2016a, 2016b; Marko et al., 2018b; Nasmyth, 2001; Riggs, 1990) (**Figure 11 panneaux du bas**).

Récemment, le complexe actif de Condensine de *S. cerevisiae* a été montré *in vitro*, comme capable de fixer l'ADN nu sans spécificité de séquence et de se déplacer dessus en présence d'ATP (Terakawa et al., 2017). De plus, le complexe extrude une boucle d'ADN en présence d'ATP *in vitro* (Ganji et al., 2018). L'entrée de l'ADN dans le complexe, et donc la formation de la boucle se fait de manière unidirectionnelle sur l'ADN ce qui semble être une conséquence directe de l'accrochage via la « ceinture de sécurité » proposée par (Kschonsak et al., 2017).

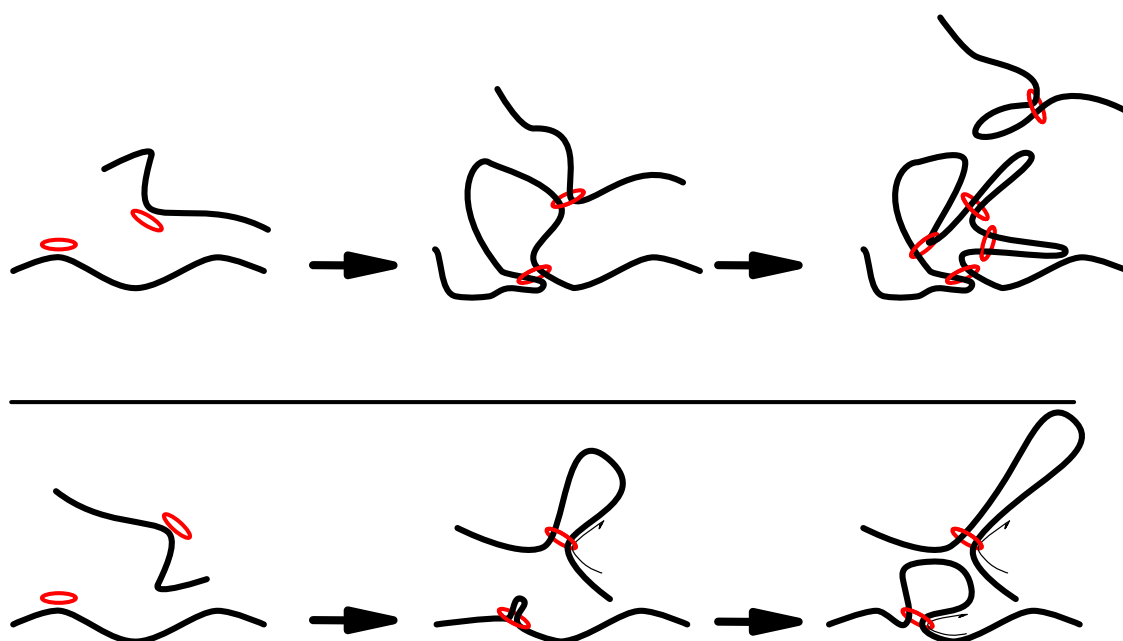


Figure 11. Deux modèles pour expliquer le mécanisme de condensation de l'ADN

Panneaux du haut : Le modèle de réticulation stochastique. Panneaux du bas : Le modèle d'extrusion de boucles.

Les mécanismes moléculaires permettant l'extrusion d'une boucle de chromatine par le complexe Condensine restent pour le moment largement incompris chez les eucaryotes. Le

modèle le plus abouti actuellement est issu du travail sur les protéines Smc du procaryote *B. subtilis*.

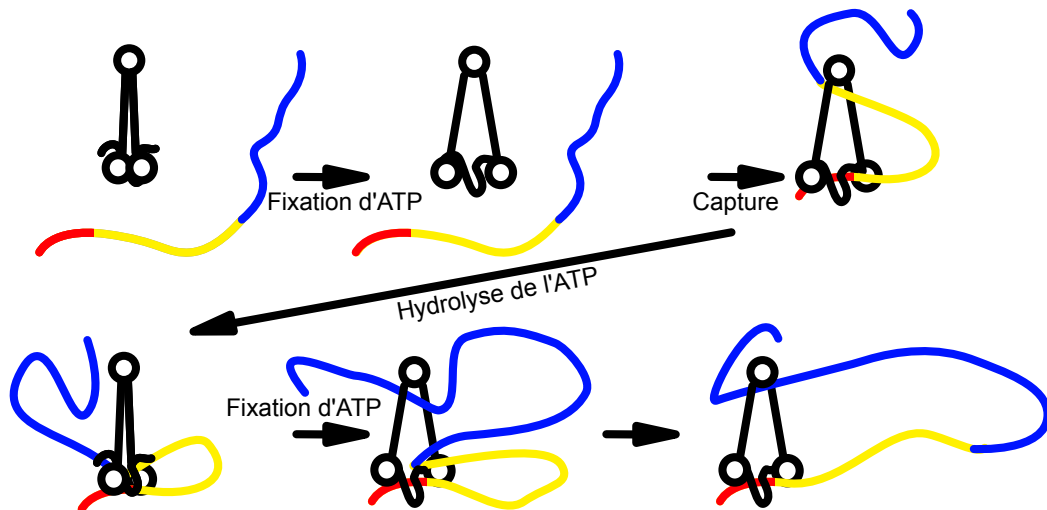
Le complexe Smc de *B. subtilis* semble capable d'extruder une boucle d'ADN *in vivo* (Wang et al., 2018). Un modèle de condensation chez *B. subtilis* propose la présence de deux chambres dans lesquelles peuvent passer deux brins d'ADN. La fixation d'ATP au complexe Smc permettrait son passage en configuration « A » laissant entrer l'ADN qui interagirait alors avec le *hinge*. L'hydrolyse de l'ATP induirait une fermeture des bras et le transfert du site d'ADN initialement lié au *hinge* vers une deuxième chambre formée par les protéines non Smc. La réouverture du complexe et le début d'un autre cycle permettrait alors la capture d'un nouveau locus d'ADN. Des cycles successifs permettraient la croissance de la boucle (Diebold-Durand et al., 2017; Marko et al., 2018b) (**Figure 12 panneau du haut**).

Si ce modèle semble probable pour les procaryotes, aucune structure publiée du complexe chez les eucaryotes ne soutient pour l'instant l'existence de ces deux chambres. La structure montrant le passage d'un seul brin d'ADN dans la poche formée par Ycg1/Brn1 est incomplète et ne permet pas de conclure sur l'ensemble de la partie *kleisin*/HEAT du complexe (Kschonsak et al., 2017). Il est donc possible qu'une interaction existe avec les têtes ATPase ou avec Ycs4 pour former cette deuxième chambre. De plus, les régions *coiled-coil* paraissent flexibles en AFM (Eeftens et al., 2016). Mais rien ne montre que la flexibilité des *coiled-coil* ne soit nécessaire à l'activité de Condensine.

Il est possible que les mécanismes moléculaires de condensation par les Smc ne soient pas exactement conservés entre procaryotes et eucaryotes. On peut imaginer que le changement de conformation du complexe soit différent entre ces deux domaines du vivant. La déformation du complexe servirait alors à permettre une liaison du *hinge* avec l'ADN puis à être ramenée vers la partie *kleisin* pour élargir la boucle comme montré (**Figure 12 panneau du bas**)

De plus, la réplication et la ségrégation du génome sont concomitantes chez les procaryotes (Gruber, 2018). Le complexe Smc de *B. subtilis* est donc à la fois une Cohésine et une Condensine. (Wells et al., 2017) décrivent que les protéines régulatrices du complexe qui sont associées à la *klésin* chez *B. subtilis* possèdent des motifs différents de ceux présents chez les eucaryotes. Il est donc possible que la spécialisation des complexes ait entraîné l'apparition d'un mécanisme moléculaire différent d'extrusion de boucles.

B. subtilis



Eucaryotes

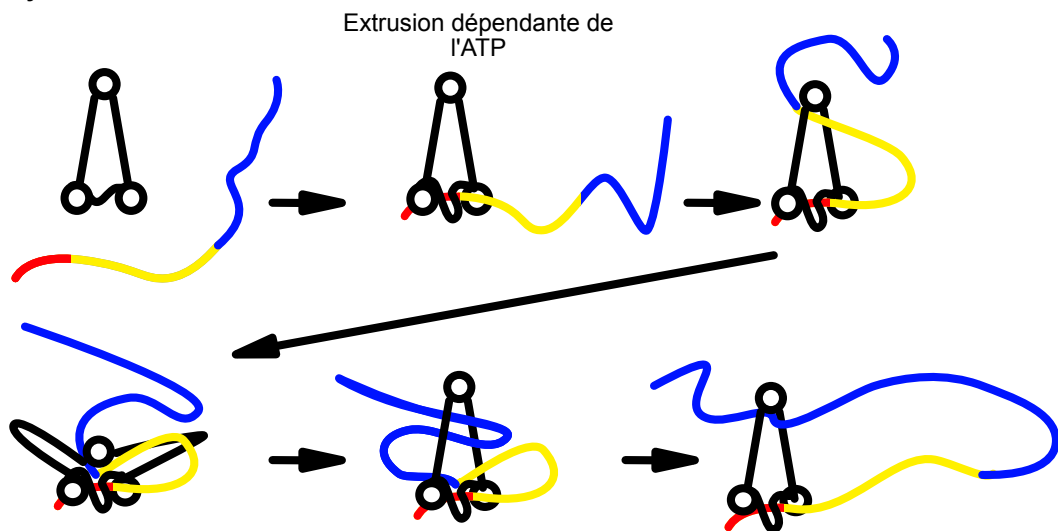


Figure 12. Mécanismes possible de condensation de l'ADN chez les eucaryotes et chez *B. subtilis*

Panneaux du haut : La fixation d'ATP promeut le passage du complexe Smc en conformation A. Ceci permet l'entrée d'ADN dans la chambre du haut et la fixation d'un autre loci dans la chambre du bas. L'hydrolyse de l'ATP mène au passage de l'ADN fixé au hinge vers la chambre du bas. Des cycles successifs permettent l'élargissement de la boucle.

Panneau du bas : Chez les eucaryotes, la fixation de l'ADN par la poche Brn1/Ycg1 et par le hinge pourrait permettre l'élargissement de la boucle via des mouvements imposés sur les coiled-coil.

c) Partenaires de Condensine

i) Facteurs nécessaires à la condensation des chromosomes

Si Condensine a un rôle essentiel dans la formation de boucles de chromatine, son action seule ne suffit pas à former un chromosome condensé (Shintomi et al., 2015). L'utilisation d'extraits mitotiques chez *X. laevis* a permis la reconstitution de chromosomes mitotiques *in vitro*. Ainsi, un nombre minimal de protéines purifiées permettent la transformation d'un chromosome lié à des protéines spécifiques du sperme vers une forme semblable à un chromosome mitotique. En plus des facteurs responsables du retrait des protéines spécifiques et de la formation de nucléosomes canoniques, le complexe Condensine et la Topoisomérase II sont nécessaires à la formation de chromosomes mitotiques. Un complexe en charge du remodelage de la chromatine, FACT, est également essentiel, ce qui suggère que les nucléosomes puissent être un obstacle à la condensation *in vivo* (Shintomi et al., 2015) soit en bloquant la fixation soit en bloquant l'activité de Condensine. En l'absence de nucléosome, Condensine reste capable de condenser l'ADN, en présence de Topoisomérase II uniquement (Shintomi et al., 2017). Cependant, les structures formées sont plus fragiles. Il existe donc un premier niveau de structuration consistant en l'enroulement de l'ADN autour des nucléosomes et un second niveau constitué des boucles de chromatine formées par Condensine. Même si les deux niveaux de structuration semblent indépendants, ils sont tout les deux nécessaires au façonnement du chromosome mitotique *in vivo*.

De plus, l'activité de Condensine de *S. cerevisiae* est visible *in vitro* sur de l'ADN nu de phase λ (Ganji et al., 2018; Terakawa et al., 2017). Ceci démontre que Condensine n'a besoin de nucléosome ni pour son chargement, ni pour son activité de condensation *in vitro* et qu'aucune spécificité de séquence n'est requise pour l'extrusion d'une boucle d'ADN.

ii) Topoisomérase II- α

La topoisomérase II (Top2) est une enzyme essentielle responsable de la décaténation des chromosomes après la réplication (Sundin and Varshavsky, 1980). L'utilisation d'un dégron Top2 montre que la protéine débobine les sur-enroulements de l'ADN en mitose chez *S. cerevisiae*, pour permettre la ségrégation des chromosomes (Baxter et al., 2011) et que les chromatides sœurs non-décaténées forment des ponts d'anaphase (Baxter and Diffley, 2008). Un phénotype semblable est observé lors de l'inactivation ou du clivage de Condensine (Charbin et al., 2014; Cuylen et al., 2013). Ces ponts d'anaphase sont constitués de

chromatine étirée par le fuseau en anaphase. En l'absence de Condensine, ces ponts présentent un étirement moins important ce qui montre deux rôles distincts en anaphase pour Top2 et Condensine (Renshaw et al., 2010). Cependant, contrairement à Condensine, Top2 n'est requise que pour la formation des chromosomes condensés et pas pour leur maintien chez *X. laevis*, *D. melanogaster* et *S. pombe* (Hirano and Mitchison, 1993; Swedlow et al., 1993; Uemura et al., 1987) ce qui est attendu pour une activité de décaténation.

La déplétion de Top2, dans les expériences *in vitro* décrites plus haut chez *X. laevis*, montre que l'absence de Topoisomérase II induit une hypercondensation de l'ADN par Condensine et un échec à individualiser les chromosomes, qui se présentent alors sous la forme d'une masse unique (Cuvier and Hirano, 2003).

L'activité de Top2 consiste en le clivage transitoire de l'ADN double brin pour permettre le passage d'une double-hélice d'ADN au travers d'une autre avant une religation. Ceci permet ainsi de libérer les contraintes provoquées par la présence d'emmêlements de brins d'ADN (catenants). Cependant, Top2 va cliver et religuer les brins sans « savoir » s'ils provoquent des contraintes topologiques qui pourraient gêner la ségrégation. Top2 est donc responsable de cycles successifs de caténation/décaténation de la chromatine. La condensation de la chromatine par l'ADN biaise l'activité de Top2 dans le sens de la décaténation des brins. En d'autres termes, l'individualisation progressive des chromatides sœurs et l'augmentation des fréquences de contact entre les points proches provoquée par Condensine augmentent les chances que Top2 libère une contrainte topologique et diminue les chances qu'elle en crée une. Ce biais de décaténation est ensuite renforcé par l'éloignement physique des chromatides sœurs en anaphase bloquant définitivement toute chance de recréer un caténant (Sen et al., 2016; Wood and Earnshaw, 1990) (**Figure 13**).

Chez *Drosophila melanogaster*, l'inactivation de Condensine en fin de métaphase provoque une hypercondensation de l'ADN et un défaut de ségrégation montrant que l'absence de Condensine promeut le ré-enchevêtrement des chromosomes (Piskadlo et al., 2017). Condensine et Top2 ont donc des rôles complémentaires dans l'individualisation des chromosomes.

Chez *S. cerevisiae*, Top2 se lie moins aux chromosomes mitotiques en l'absence de Condensine (Leonard et al., 2015). Le recrutement de Condensine ne dépend pas de Top2 (Leonard et al., 2015).

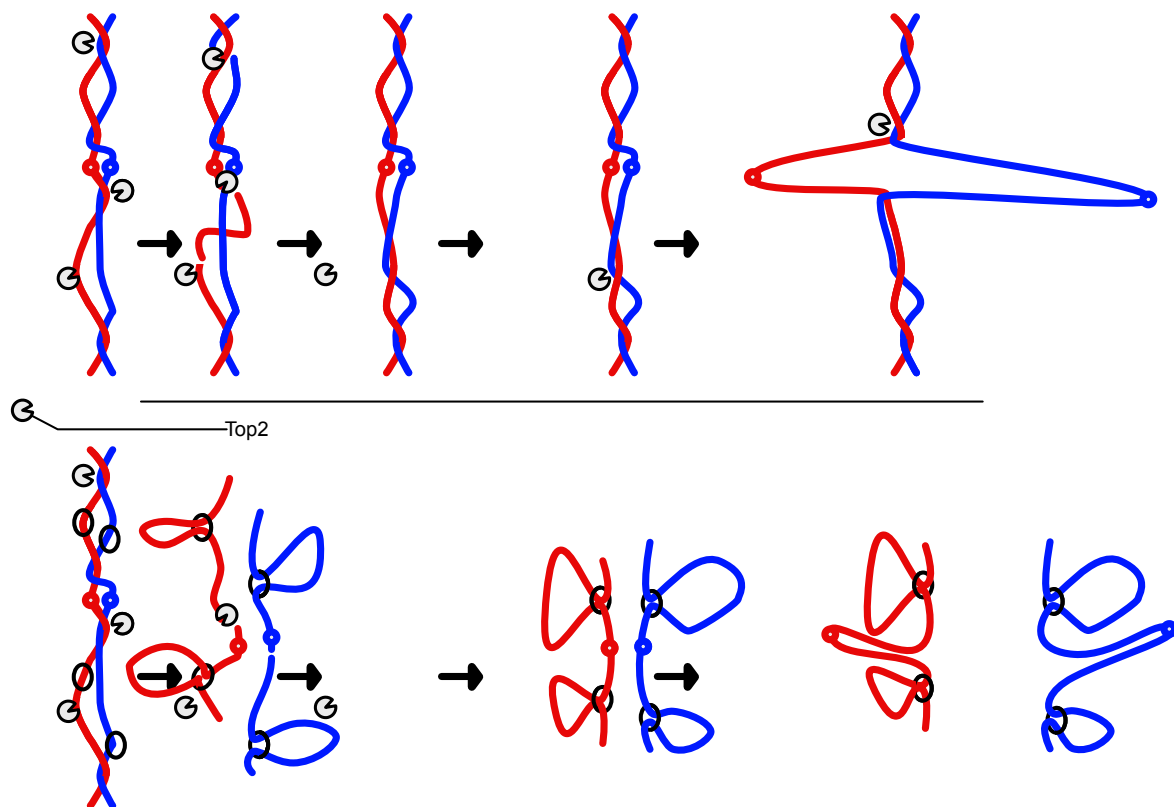


Figure 13. Coopération entre Condensine et Top2

Sans Condensine (anneaux noirs) (Panneau du haut), Top2 est incapable de défaire la caténation entre les chromatides sœurs (bleue et rouge) ce qui mène à une incapacité à les ségréger en anaphase. Panneaux du bas : Condensine en formant des boucles favorise la décaténation par Top2 et permet une ségrégation efficace.

Condensine est donc un complexe qui a un rôle principal d'organisation des chromosomes en mitose pour permettre leur ségrégation et éviter qu'ils ne soient endommagés.

Deux modèles pourraient expliquer la manière dont les Condensines forment des boucles. S'il est probable que Condensine extrude des boucles *in vivo*, il reste possible que ces complexes puissent également crosslinker aléatoirement des chromatides.

Les Condensines agissent de concert avec les nucléosomes pour structurer les chromosomes métaphasiques. Top2 est également essentielle à la décaténation des chromosomes et à leur individualisation pour permettre leur ségrégation en anaphase.

5) Régulation des Condensines au cours du cycle cellulaire

Chez *S. cerevisiae*, Condensine est présente dans le noyau tout au long du cycle cellulaire ce qui signifie que l'activité du complexe doit être régulée pour éviter une condensation constitutive du chromosome en interphase et permettre une décondensation en télophase/G1. Il existe différents mécanismes de contrôle de la transcription, du chargement, de l'activation et du déchargement de Condensine.

a) Régulation transcriptionnelle

Chez *S. cerevisiae*, la synthèse de Ycg1 est régulée au cours du cycle cellulaire et débute en fin de phase S. Ceci ne permet la formation d'un grand nombre de complexes actifs qu'en mitose (Doughty et al., 2016).

Ce mode de régulation pourrait également être conservé chez tous les eucaryotes, la transcription de la sous unité Cnd1^{Ycs4} chez *S. pombe* étant également régulée au cours du cycle (Schiklenk et al., 2018).

b) Modifications post-traductionnelles régulant Condensine

i) Activation de la condensation par les kinases CDK1, Cdc5 et Ipl1

Le complexe Condensine purifié en interphase ne présente pas d'activité de surenroulement de l'ADN *in vitro* alors que le complexe purifié en mitose après sa phosphorylation par CDK1 présente cette activité (St-Pierre et al., 2009). Cette phosphorylation a lieu au niveau de la queue N-terminale de la sous-unité Smc4. Cette queue N-terminale est conservée évolutivement dans la famille des protéines Smc4 mais n'existe pas parmi la famille des protéines Smc2 (Robellet et al., 2015). La phosphorylation précoce en début de mitose de la sous-unité Smc4 du complexe par Cdc28/CDK1 est le signal permettant une fixation plus stable de Condensine à l'ADN et déclenchant l'activité de condensation en fin de phase S/ début de mitose. Forcer la phosphorylation de Smc4 en phase G1 induit également une condensation précoce de la chromatine. Cet effet est cependant plus faible qu'en début de mitose, indiquant la mise en jeu d'autres acteurs (Thadani et al., 2018) et peut-être une synthèse trop faible d'Ycg1.

En effet, le complexe Condensine est également phosphorylé au niveau de ses sous-unités activatrices Ycs4, Ycg1 et Brn1 par Cdc5^{Polo kinase}. La phosphorylation de ces sous-unités provoque une augmentation de l'activité de Condensine *in vitro*. Elle est également requise pour la condensation *in vivo* du rDNA. Il est possible Cdc5 ait pour rôle de rendre le complexe pleinement actif, notamment pour condenser le rDNA.

Ycg1 peut également être phosphorylée par la kinase active en mitose Ipl1^{Aurora B}. Cette phosphorylation est nécessaire à la ségrégation du rDNA, en fin d'anaphase/début de télophase (Lavoie et al., 2004). Il est donc possible que la condensation des ponts chromatinien présents en anaphase puisse dépendre de l'activation de Condensine par Ipl1 (**Figure 14**).

Condensine est donc un complexe dont l'activité est finement régulée et à plusieurs niveaux. Sa transcription est régulée. Son chargement requiert sa phosphorylation par CDK1 (Leonard et al., 2015; St-Pierre et al., 2009). Sa pleine activation nécessite les kinases Cdc5 et Ipl1 qui agissent uniquement en mitose. L'absence d'une de ces kinases ne permet pas de condenser correctement les chromosomes.

ii) Déphosphorylation et décondensation

Le timing exact de décondensation est encore mal défini mais il semble dépendre de l'activation du réseau de sortie mitotique et commencer en télophase (Varela et al., 2009).

Au cours du cycle, la phosphatase Cdc14 est séquestrée par la protéine du nucléole Net1 et l'activité de CDK1 dans la cellule augmente progressivement jusqu'à un maximum en mitose. Une première libération de la phosphatase est faite en début d'anaphase, que l'on appelle *FEAR* (Cdc14 Early Anaphase Release). Elle favorise la condensation et la ségrégation du rDNA, ainsi que la synchronie des événements de sortie de mitose. Cette première vague de Cdc14 n'est pas strictement nécessaire, cependant elle favorise la viabilité cellulaire. A ce stade du cycle, l'activité élevée de CDK1 maintient la condensation. Néanmoins l'augmentation de l'activité de la phosphatase est corrélée à une diminution de l'activité kinase de CDK1 (D'Amours et al., 2004; Machín et al., 2016; Touati and Uhlmann).

L'activation du réseau de sortie mitotique provoque une seconde vague de relâche de Cdc14 ce qui augmente ainsi l'activité phosphatase et diminuent fortement l'activité de CDK1 via la déphosphorylation et l'activation de son inhibiteur, Sic1 (Baro et al., 2017; de los Santos-Velázquez et al., 2017). Cette seconde vague de déphosphorylation, ainsi que la baisse de l'activité de CDK1, inactiverait le complexe et provoquerait la décondensation de la

chromatine en fin d'anaphase/télophase en baissant l'affinité du complexe pour l'ADN (Varela et al., 2009). La phosphatase responsable de la déphosphorylation des différentes sous-unités de Condensine reste inconnue.

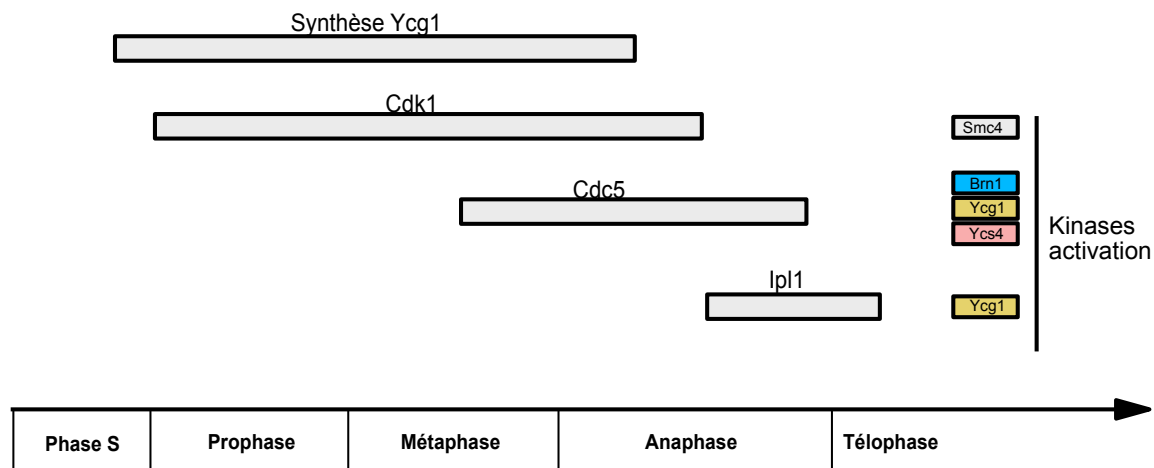


Figure 14. Régulation de Condensine au cours du cycle

Inspiré de (Piazza et al., 2013). Schéma de la cinétique de contrôle de Condensine par sa transcription et par les modifications post-traductionnelles affectant ses différents composants.

iii) Ubiquitination de Condensine et dynamique de fixation

Condensine I se fixe dynamiquement sur l'ADN avec un temps de renouvellement rapide alors que Condensine II est plus stable (Walther et al., 2018). Dans des cellules HeLa, (Gerlich et al., 2006) estime qu'environ 20% des Condensines I sont attachés de manière stable et fixe à l'ADN quand 80% se déplacent et se décrochent de manière dynamique. Ainsi, il pourrait exister i) différents modes de fixation possible de Condensine sur la chromatine ii) une régulation active de la fixation de Condensine.

Chez *S. cerevisiae*, (Thattikota et al., 2018) propose un mécanisme actif de décrochage de Condensine en phase M, dans lequel la sous-unité Ycg1 des Condensines bloquées seraient ubiquitinées par une E2/E3 ligase encore inconnue. Ceci permettrait la reconnaissance de ces complexes par la ségrégase Cdc48 et leur décrochage de l'ADN pour leur permettre de recommencer un cycle de fixation. Impacter négativement cette dynamique d'accrochage induit une perte de la capacité totale de condensation des chromosomes. Ceci pourrait être expliqué par un blocage des complexes les uns sur les autres. Le coefficient de diffusion des

Condensines est cependant peu affecté, ce qui peut laisser penser que d'autres mécanismes sont également en jeu pour permettre cette mobilité.

Chez les mammifères, la Condensine II étant stable vis à vis de la Condensine I, il serait intéressant de regarder les différentes modifications post-traductionnelles auxquelles elles sont exposées respectivement et de voir si une différence d'ubiquitination d'un complexe par rapport à l'autre existe.

iv) Conservation des mécanismes chez les autres eucaryotes

Les différentes régulations de Condensine par la phosphorylation semblent être conservées chez les eucaryotes. Chez *S. pombe*, la phosphorylation de la queue N-terminale de Smc4/Cut3 par CDK1 permet l'entrée de Condensine dans le noyau et le début de la condensation (Sutani et al., 1999).

Chez *X. laevis*, l'utilisation de Condensines extraites en interphase, et donc non phosphorylées par CDK1, n'induit pas de condensation des chromosomes *in vitro*, un défaut secouru par l'ajout de CDK1 dans la réaction ou l'utilisation d'extraits mitotiques (Shintomi et al., 2015).

Chez les eucaryotes possédant les deux types de Condensine. Condensine II est nucléaire tandis que Condensine I est cytoplasmique. En mitose, Condensine II est activé par CDK1 et se lit à l'ADN pour former de grandes boucles, réparties autour d'un axe de manière hélicoïdale. Cependant, l'implication de la cycline A ou de la cycline B dans ce processus est soumise à débat (Bazile et al., 2010). La rupture de l'enveloppe nucléaire en prométaphase donne accès à l'ADN à Condensine I, qui formera alors de plus petites boucles à partir des grandes boucles formées par Condensine II, après sa phosphorylation par CDK1/cycline B (Gibcus et al., 2018; Hirano, 2016).

Aurora B phosphoryle également Condensine dans les autres organismes modèles, cependant sa fonction semble varier. Chez *S. pombe*, la phosphorylation de la *kleisin* par Aurora B est nécessaire à la fixation de Condensine sur la chromatine, de la prométaphase à la télophase (Nakazawa et al., 2011). Dans les cellules HeLa, Aurora B contrôle la fixation de Condensine I à la chromatine mais pas celle de Condensine II (qui se fait avant son activation lors de la prophase) (Lipp et al., 2007). Il est d'ailleurs proposé que la phosphorylation médiée par Aurora B dirige le site de fixation de Condensine à l'ADN (Piazza et al., 2013).

Polo kinase phosphoryle les sous-unités de Condensine chez les métazoaires (xénopes, drosophiles, cellules humaines) mais son rôle reste encore largement inconnu (Poonperm et al., 2017).

6) Condensine sur le chromosome *in vivo*

a) Sites préférentiels de fixation à l'ADN et condensation du chromosome

Les études *in vitro* montrent que Condensine peut fixer l'ADN nu pour former des boucles (Ganji et al., 2018). Cependant, le mode de recrutement de Condensine dans un contexte physiologique reste mal compris. De même, la manière dont les différents complexes s'organisent entre eux pour former un chromosome condensé reste méconnue.

i) Recrutement de Condensine aux régions péricentromériques

Chez *S. cerevisiae*, Condensine est enrichie aux régions péricentromériques en métaphase (D'Ambrosio et al., 2008; Leonard et al., 2015). Cet enrichissement est renforcé en présence de nocodazole, peut-être en réponse à une activation du point de contrôle d'assemblage du fuseau mitotique (SAC). Condensine pourrait participer à la structuration des centromères et participer à la bi-orientation des chromosomes (Leonard et al., 2015). La concentration de Condensine aux régions péricentromériques réduit avec l'avancée en mitose pour s'uniformiser sur l'ensemble des bras de chromosomes au cours anaphase. On peut donc supposer i) que les Condensines se déplacent le long du chromosome au cours du cycle ii) que leur dynamique en anaphase permet un recrutement à des régions différentes des chromosomes.

L'isolation relative des centromères en mitose dépend de Condensine (Lazar-Stefanita et al., 2017; Schalbetter et al., 2017). Celle-ci augmente au cours de la mitose pour atteindre un maximum en métaphase/télophase (Lazar-Stefanita et al., 2017) ce qui semble décorrélié au nombre de molécules de Condensine présentes aux régions péricentromériques à cette phase du cycle (Leonard et al., 2015).

Le complexe *Shugoshin* impliqué dans le maintien de la cohésion des centromères, le contrôle de tension des microtubules, et la bi-orientation des chromosomes est localisé aux régions péricentromériques en métaphase et est dégradé en anaphase. Il est proposé qu'il soit responsable du recrutement de Condensine aux centromères. Sa dégradation en anaphase permettrait le recrutement des Condensines ailleurs sur le génome. Il est proposé que

Shugoshin ait également un rôle de séquestration du complexe en métaphase pour contrôler son activité (Peplowska et al., 2014). L'augmentation de la présence de Condensine aux centromères, observée par (Leonard et al., 2015) en réponse à une dépolymérisation des microtubules en métaphase pourrait être expliquée par le gain de la localisation centromérique de *Shugoshin* dans ces conditions. L'augmentation de la présence de Condensine aux centromères pourrait donc être la conséquence de l'augmentation de la présence de *Shugoshin* observée par (Nerusheva et al., 2014).

Par ailleurs, Condensine, recruté par *Shugoshin* favorise le recrutement de la kinase Ip11^{AuroraB} aux centromères en métaphase et la bi-orientation du fuseau (Nerusheva et al., 2014).

ii) Recrutement aux autres loci

Les Condensines sont recrutées préférentiellement aux tRNAs en métaphase (D'Ambrosio et al., 2008) et leur isolation dépend de ce recrutement (Haeusler et al., 2008).

Ce recrutement aux tRNAs pourrait être médié par plusieurs facteurs :

- La protéine Scc2 requise pour le chargement de Cohésine co-localise sur l'ADN avec Condensine notamment aux tRNAs. Scc2 pourrait favoriser le recrutement de Condensine. Ceci expliquerait que Condensine ait besoin de Cohésine pour condenser correctement le chromosome *in vivo* (Ciosk et al., 2000). De plus, chez *S. cerevisiae*, Cohésine forme des boucles au sein d'une même chromatide et est ainsi en partie responsable de la condensation des chromosomes en métaphase. Une coopération entre Cohésine et Condensine est donc possible (Schalbetter et al., 2017).
- Le complexe *Cohibin* (Csm1-Lsr4) localisé à la fois aux centromères et au rDNA favorise le recrutement de Condensine à ces loci (Brito et al., 2010).
- Comme mentionné plus haut, la présence du rDNA sur le bras droit du chromosome XII en fait le plus long de *S. cerevisiae*. Un degré de compaction de deux, tel qu'il est mesuré pour les autres chromosomes n'est pas compatible avec sa ségrégation. Celui-ci a donc besoin d'être hypercondensé en mitose (Guacci et al., 1994; Harrison et al., 2009; Lavoie et al., 2004; Machín et al., 2005). Il a été montré que cette hypercondensation en anaphase dépendait de la première libération de Cdc14 (D'Amours et al., 2004).

En effet, l'inactivation de Cdc14 avant l'anaphase entraîne la formation de ponts d'anaphase provoqués par la non disjonction des chromatides sœurs du Chromosome XII. Les chromosomes à bras courts sont cependant ségrégés normalement dans les mutants d'activité de Cdc14 présentant un fuseau court et une condensation faible (Quevedo et al., 2012). De

plus, la restauration de l'activité de Cdc14 suffit à corriger la ségrégation incomplète du rDNA, même après dépolymérisation du fuseau (Machín et al., 2005).

L'activité de Condensine en anaphase sert donc à ségréger le rDNA et possiblement tous les longs chromosomes.

Cependant, certains points importants restent inconnus :

- i) Le recrutement de Condensine sur le rDNA dépend-il de facteurs spécifiques ou uniquement de la présence de chromatides non-disjointes et d'un pont d'anaphase ? La localisation de Condensine au rDNA semble dépendre au moins partiellement de la protéine orientant le départ de la fourche de réplication au rDNA et capable de la bloquer, Fob1 (Johzuka and Horiuchi, 2009; Johzuka et al., 2006). Cependant, le rDNA est correctement ségrégué en l'absence de Fob1, même si le processus est peut être plus lent comme le suggère l'augmentation de défaut de ségrégation des mutants Cdc14 (Machín et al., 2006).
- ii) Les résultats obtenus par (Titos et al., 2014) montrent une hypercondensation des bras longs des chromosomes, indépendante de la présence de rDNA. De plus, la fusion du génome de *S. cerevisiae* pour obtenir une souche à deux chromosomes de 6Mb ou à un chromosome de 11Mb (Luo et al., 2018; Shao et al., 2018) montre que les chromosomes, même excessivement longs, peuvent être condensés suffisamment pour permettre leur ségrégation. Dans ces souches, le cycle cellulaire n'est pas allongé significativement. Il semble donc que même si un mécanisme d'hypercondensation peut exister spécifiquement pour le rDNA, Condensine est capable de condenser de longs bras chromosomiques sans cela, pour maintenir la viabilité. Un mécanisme de détection des ponts d'anaphase permettant leur hypercondensation pourrait exister entre les deux vagues de relâche de Cdc14 par le FEAR puis le réseau de sortie mitotique (MEN) et pourrait dépendre d'Ipl1^{Aurora B} (Titos et al., 2014).

b) Condensine, transcription et remodelage de la chromatine

Il est proposé que Condensine soit capable d'interagir avec des histones et variant d'histones chez *S. pombe* et l'homme (Robellet et al., 2017). Chez *S. cerevisiae*, le domaine d'interaction de Brn1 avec les histones n'est pas conservé et Ipl1^{Aurora B} ne phosphoryle pas Brn1 chez *S. cerevisiae* (Piazza et al., 2013, 2014). Ceci laisse douter de la conservation de ce mode de recrutement de Condensine sur la chromatine et du recrutement de Condensine *in vivo* par les histones. De plus, l'existence des complexes Smc est antérieure à celle des nucléosomes dans

l'évolution ce qui suggère que Condensine n'a pas besoin des nucléosomes pour exercer sa fonction (Hirano, 2016).

Plusieurs évidences semblent montrer que Condensine tend à se lier à l'ADN sur des sites faiblement chargés en nucléosomes comme les sites à forte activité de transcription (tRNA, rDNA) (Bernard and Vanoosthuyse, 2015; Piazza et al., 2014; Robellet et al., 2017). Il est possible que Condensine préfère lier l'ADN nu que plutôt que la chromatine. La présence de facteurs de transcription aux loci massivement transcrits pourrait créer des zones déplétées en nucléosomes sur lesquelles Condensine se fixe. De plus, (Piazza et al., 2014) montre une corrélation inverse entre la présence de Condensine et la présence de nucléosomes.

Un rôle de la transcription n'est pas démontré dans l'établissement de la Condensation. Au contraire, le maintien de la transcription du rDNA est même responsable de non-disjonction des chromatides sœurs chez *S. cerevisiae* (Machín et al., 2006). Il est proposé que la première relâche de Cdc14 en début d'anaphase (FEAR) désactive la transcription du rDNA en déphosphorylant la RNA pol I, permettant la condensation de celui-ci (Clemente-Blanco et al., 2009). De même, la transcription des séquences subtélomériques Y' par RNA pol II est abolie par Cdc14 pour permettre la fixation de Condensine (Clemente-Blanco et al., 2011). Il semble donc que la transcription soit détrimentaire à la condensation.

Chez *S. pombe* Condensine se lie aux zones déplétées en nucléosomes par l'activation de la transcription (Sutani et al., 2015; Toselli-Mollereau et al., 2016).

En présence de nucléosomes, (Shintomi et al., 2015) montrent que la chaperonne « FACT » est nécessaire pour permettre la condensation par Condensine, ce qui laisse penser qu'un remodelage de la chromatine est requis pour faciliter la fixation du complexe ou son activité. Ce remodelleur est dispensable en l'absence de nucléosome (Shintomi et al., 2017) ce qui semble confirmer l'interaction négative entre les nucléosomes et le chargement ou la progression de Condensine sur l'ADN (Robellet et al., 2017).

Il n'y a pour l'instant aucune évidence d'une capacité ou pas de Condensine à condenser l'ADN nucléosomal sans défaire les nucléosomes.

c) Condensine aux télomères ?

En fin d'anaphase, une plus grande présence de Condensine est observée aux extrémités des chromosomes ce qui peut correspondre à une avancée maximum de Condensine sur l'ADN et à son blocage aux télomères (D'Ambrosio et al., 2008; Leonard et al., 2015). (Walther et al., 2018) signalent également une plus forte quantité de Condensine I et II aux télomères dans leurs cellules humaines. Il est possible que Condensine soit *roadblocké* par les télomères pour éviter que les complexes ne chutent aux extrémités des chromosomes. La condensation pourrait alors être maintenue sur toute la longueur du chromosome.

IV) Cytodiérèse et croissance du septum chez *S. cerevisiae*

La cytotiérèse est le mécanisme conduisant à la séparation physique des deux cytoplasmes, au cours de la télophase. Chez *S. cerevisiae* elle se déroule en plusieurs étapes qui commencent bien avant le début de la mitose (Weiss, 2012).

En G1, l'assemblage des septines définit la localisation du site de bourgeonnement et permet le recrutement concomitant des molécules de myosine II qui formeront l'anneau d'actomyosine. Le bourgeon grossit au long du cycle cellulaire de l'autre côté de l'anneau de septines. En télophase, Cdc14 et le réseau de sortie mitotique (MEN) activent la contraction de cet anneau d'actomyosine. Celui-ci guide la croissance d'un septum primaire. Le septum primaire est recouvert d'un septum secondaire. L'anneau d'actomyosine est dépolymérisé avant la fin de la septation et le processus est fini lors d'une étape nommée abscission, qui pourrait consister en la simple croissance du septum secondaire. Enfin, une digestion partielle et un remodelage des septa permettent la séparation physique des cellules. Même si l'anneau d'actomyosine et le septum primaire sont utiles pour une cytotiérèse efficace, seul le septum secondaire est essentiel (Tolliday et al., 2003). En l'absence des enzymes responsables de sa formation un septum secondaire compensatoire peut être synthétisé de manière anarchique pour clore l'espace entre les deux cellules en division (Onishi et al., 2013; Shaw et al., 1991).

Au cours de la fin de mitose a également lieu la fission des noyaux. Le processus est encore mal compris. Néanmoins il semblerait purement passif et provoqué par l'élongation des noyaux et la ségrégation des chromosomes. Lors de l'activation du MEN, la dépolymérisation du fuseau mitotique pourrait entraîner une scission de la membrane et une refusion pour former les deux membranes nucléaires distinctes.

1) Le rôle des septines

Les septines sont des protéines semblables à celles du cytosquelette. Il en existe 5 ayant un rôle en mitose chez *S. cerevisiae*, qui s'assemblent pour former des hétéro-oligomères de formes circulaires appelés « anneau de septines ».

Cet anneau commence par s'assembler par patches sur la membrane puis prend une forme d'anneau et définit la zone de croissance du bourgeon et de cytodierèse (Caviston et al., 2003; Iwase et al., 2006). Après l'émergence du bourgeon, l'anneau de septines s'étend pour prendre la forme d'un sablier de part et d'autre du cou (Oh and Bi, 2011; Ong et al., 2014; Vrabioiu and Mitchison, 2006). Lors de l'activation du MEN en anaphase, ce sablier prend la forme de deux anneaux de part et d'autre du site de constriction (Wloka and Bi, 2012). La présence des septines limite la diffusion des protéines membranaires entre la cellule mère et la cellule fille (Shcheprova et al., 2008). Les protéines nécessaires à la contraction de l'anneau d'actomyosine se concentrent alors entre les deux anneaux de septines (Dobbelaere and Barral, 2004; McMurray and Thorner, 2009) (**Figure 15A, B**).

Il est intéressant de noter que le processus d'assemblage de l'anneau de septines et sa capacité à se diviser en anaphase dépend de la protéine Bud4. *BUD4* est accidentellement muté dans le fond génétique W303. L'absence de fonction de la protéine provoque un effondrement du sablier de septines en fin d'anaphase. La mutation de *BUD4* ne semble pas avoir de conséquence vis à vis du processus de cytodierèse dans le fond W303. Elle rend cependant létales certaines mutations de gènes impliqués dans la formation et la croissance de la paroi cellulaire (Eluère et al., 2012; Wloka et al., 2011).

2) L'anneau d'actomyosine et la formation du septum primaire

a) Recrutement de l'anneau d'actomyosine et synthèse du septum primaire

Le recrutement de l'anneau d'actomyosine débute dès le recrutement des septines en G1 (Finnigan et al., 2015; Lee et al., 2002). Le recrutement de Myo1, une myosine de type II, est restreint au milieu du collier de septines. La contrainte imposée par l'anneau de septines force un agencement des myosines sous la forme d'un anneau (Meitinger and Palani, 2016; Weiss, 2012). Le recrutement des myosines se termine en début de mitose (Finnigan et al., 2015; Lee et al., 2002). Lors de l'entrée en anaphase, l'actine est recrutée pour finir de former l'anneau d'actomyosine.

La façon dont le réseau de sortie de mitose contrôle le début de la constriction de l'anneau reste mal connue. La diminution de l'activité kinase de CDK1 ainsi que l'augmentation de l'activité de la phosphatase contrebalançant son activité (Cdc14) entraîne la déphosphorylation des protéines impliquées dans l'anaphase et la cytodierèse (Kuilman et al., 2015).

L'activation du MEN provoque le remodelage des septines en fin d'anaphase permettant la perte de la rigidité de la membrane au niveau du cou du bourgeon. Ceci permet l'initiation de la contraction centripète de l'anneau (**Figure 15B**).

Les moteurs moléculaires de cette constriction restent mal connus. Une partie de la force vient des têtes de myosines qui vont ramper sur les molécules d'actines. Cependant, ce mécanisme actif ne compte que pour une partie de la force permettant la constriction. Un anneau formé de molécules de myosine sans tête peut se contracter (Fang et al., 2010; Lord et al., 2005). En effet, l'anneau d'actomyosine joue également un rôle d'organisateur des filaments d'actine. Il favorise le guidage des vésicules délivrant les protéines et molécules permettant la croissance des septa (Fang et al., 2010). La croissance du septum primaire pourrait alors être suffisante pour pousser les membranes (Fang et al., 2010).

La constriction de l'anneau d'actomyosine dépend du septum primaire. En effet, les mutants du septum primaire forment un anneau incapable de se contracter et les mutants ne formant pas de septum primaire ne présentent pas de contraction d'anneau (Schmidt et al., 2002).

Le septum primaire est constitué de chitine c'est à dire d'un polymère de N-acetylglucosamine (5NG). Il existe trois synthétases de chitine chez *S. cerevisiae*. La principale Chs2 est synthétisée et maintenue dans le réticulum endoplasmique durant tout le cycle cellulaire. Sa déphosphorylation par Cdc14 permet son exocytose au niveau du lieu de cytodivision, guidé par une interaction anneau d'actomyosine-Spa2-Chs2 (Foltman et al., 2018). Chs2 forme alors un pore permettant la sortie et l'assemblage des 5NG qui formeront les polymères de chitine (**Figure 15C**).

b) La dépolymérisation de l'anneau d'actomyosine

Chez *S. cerevisiae*, l'anneau d'actomyosine est complètement dépolymérisé avant la fin de la cytodivision et ne participe ainsi pas à la fin du processus de fermeture. Ce désassemblage est concomitant à la croissance du septum secondaire (Weiss, 2012). De plus, un mécanisme actif de dépolymérisation dépendant du cyclosome favorise sa déstabilisation alors que son diamètre est encore de 100 à 150 nm (Tully et al., 2009).

Le septum primaire et l'anneau d'actine ne finissent pas la cytodivision. Cette observation vient du fait que i) l'anneau d'actomyosine est dépolymérisé avant la fin de la cytodivision ii) dans des cellules sauvages ayant terminé leur cytodivision, on peut voir un orifice laissé au milieu du septum primaire. Celui-ci est comblé par le septum secondaire (Onishi et al., 2013).

3) Le septum secondaire

La croissance d'un second septum est donc nécessaire pour séparer définitivement les deux cytoplasmes des cellules. Ce dernier est synthétisé indépendamment dans la cellule mère et dans la cellule fille de chaque côté du septum primaire. La synthèse a lieu concomitamment des deux côtés du septum primaire. Le septum secondaire est en grande majorité composé de chaînes de glucanes et d'un faible pourcentage de chitine (Shaw et al., 1991).

La chitine du septum secondaire est principalement synthétisée par l'enzyme Chs3 qui va polymériser des molécules pour former des chaînes après le rapatriement de Chs2 vers l'appareil de Golgi.

Les complexes glucane synthétases se fixent également dans la membrane plasmique et assemblent des chaînes de glucanes dans l'espace entre la membrane plasmique et la paroi cellulaire. La sous-unité catalytique du complexe synthétisant les glucanes est Fks1 (Inoue et al., 1995; Mazur and Baginsky, 1996). Elle possède un paralogue, Fks2 qui est activé au cours d'un stress cellulaire. Fks2 palie parfaitement l'absence de Fks1 (Inoue et al., 1995; Mazur and Baginsky, 1996) (**Figure 15D**).

La liaison entre les chaînes de glucane et de chitine est créée par un pontage effectué par les transglycosylases Crh1 et Crh2 (Blanco et al., 2015; Cabib, 2009). Le septum primaire et le septum secondaire sont également partiellement pontés entre eux grâce au concours de la glucanosyl transférase Gas1 qui crosslink aussi chitines et glucanes. L'absence de crosslink entre les glucanes ou entre les chaînes de chitine et de glucane forme une paroi cellulaire moins rigide et plus élastique. Les interactions entre les chaînes au sein du mur cellulaire garantissent donc la solidité du réseau et maintiennent la solidité de celui-ci (Dague et al., 2010).

La fin de la fermeture du mur cellulaire se fait sans anneau par un processus nommé abscission qui reste encore mal compris mais qui consiste probablement en la simple croissance du septum secondaire jusqu'à la fusion des membranes et la séparation des cytoplasmes.

Le contrôle de l'abscission pourrait passer par la protéine du cyclosome Cdh1. Cette ubiquitine ligase E3 a pour rôle de dégrader les cyclines en fin de mitose pour permettre la

progression en G1, elle créerait également une boucle d'activation positive avec Cdc14 (Hatano et al., 2016). Le mutant *cdh1Δ* présente un retard de dépolymérisation de l'anneau d'actomyosine et une plus grande fréquence d'absence de fermeture totale du septum (Ko et al., 2007; Tully et al., 2009).

Il n'y a pas d'étude des contraintes biophysiques de la septation chez *S. cerevisiae* mais il existe une étude faite chez *S. pombe*. Lors de la cytodierèse, la constriction centripète de l'anneau d'actomyosine et la croissance du septum doivent lutter contre la pression osmotique interne de la cellule pour croître et fermer la paroi cellulaire (Proctor et al., 2012). La vitesse de cytodierèse diminue lors de l'augmentation de la force osmotique contre laquelle le septum doit lutter pour croître. Comme mentionné plus haut, l'anneau n'est pas essentiel et n'est pas le principal générateur de force pour permettre la cytodierèse. Il est proposé que l'assemblage des monomères en polymères de glucane pourrait générer une force d'environ 50 pN par chaînes et ainsi atteindre quelques centaines de pN sur l'ensemble de l'anneau.

4) Séparation cellulaire

Une fois le septum complété, la destruction et le remodelage des septa pour permettre la séparation des deux cellules est opérée par les enzymes Cts1, qui digère la chitine et Egt2 et Dse4 qui digèrent les chaînes de glucanes (Weiss, 2012) (**Figure 15E**). La synthèse de ces enzymes se fait via l'activation des facteurs de transcription Ace2 et Swi5. Les deux facteurs sont transcrits spécifiquement durant la mitose et sont séquestrés hors du noyau par une phosphorylation de leur séquence de localisation nucléaire (NLS) (Mazanka et al., 2008). Leur déphosphorylation par Cdc14 permet leur entrée dans le noyau et la synthèse des enzymes impliquées dans la séparation, Cts1, Egt2 et Dse4. La re-phosphorylation de Ace2 et Swi5 permet leur sortie du noyau en fin de séparation.

Le septum secondaire constitue par la suite la paroi cellulaire des deux cellules formées. Une cicatrice reste d'ailleurs visible tout au long de la vie de la cellule (**Figure 15F**).

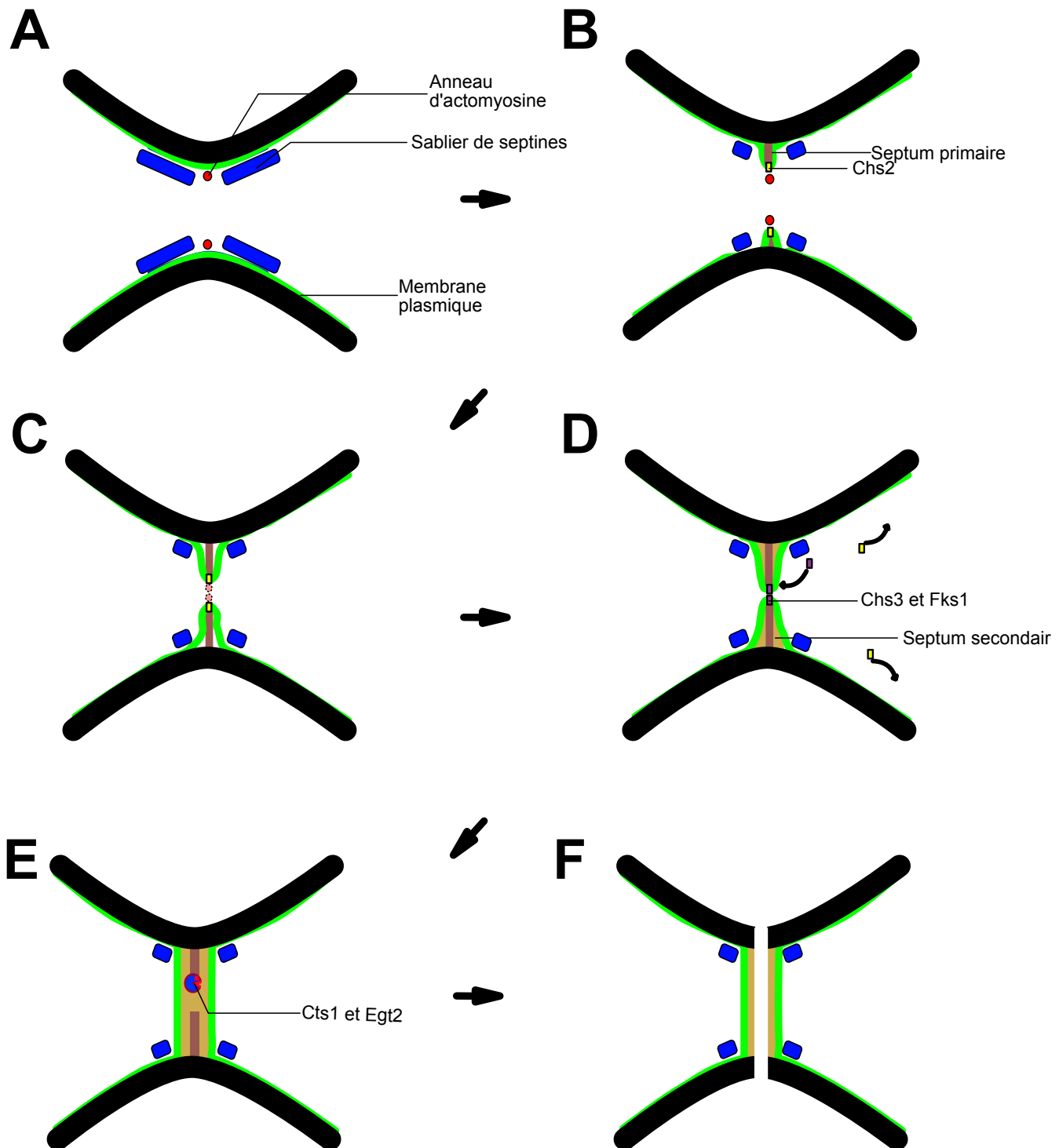


Figure 15 La septation

A) En début de cytotédièrese, l'anneau d'actomyosine (rouge) est formé et placé au milieu du sablier de septines (bleu). B) En fin d'anaphase, les septines se divisent en deux anneaux et l'enzyme C) Chs2 (jaune) débute la synthèse du septum primaire alors que l'anneau se

contracte. D) Chs2 est ensuite rapatriée dans le Reticulum Endoplasmique et les enzymes Fsk1 et Chs3 synthétisent alors le septum secondaire au dessus du septum primaire. E) Une fois le processus fini. Ace2 et Swi5 active la synthèse d'enzymes dégradant le mur cellulaire pour permettre la séparation. F) Les cellules sont séparés et présentent une cicatrice.

La cytodiérèse est donc un processus en plusieurs étapes impliquant de nombreux régulateurs. Elle fait intervenir plusieurs types de forces compatibles un avec rôle de rupture de l'ADN placé au site de constriction.

5) Le réseau de sortie mitotique

Le MEN permet une activation maximale de la phosphatase Cdc14, une diminution de l'activité CDK1 et initie le début de la cytodiérèse. Ce réseau permet également la sortie de Cdc14 du noyau vers le cytoplasme et la déphosphorylation de nombreuses protéines impliquées dans la sortie de mitose (Touati and Uhlmann).

La deuxième vague de relâche de Cdc14 dépend de l'activation de plusieurs membres du réseau de sortie mitotique (**Figure 16**). L'entrée du SPB dans la cellule fille provoque l'activation de la GTPase dans sa forme Tem1-GTP. Celle-ci active alors la kinase Cdc15 dont l'activation mène à celle de Dbf2-Mob1. Dbf2-Mob1 active enfin pleinement Cdc14.

L'utilisation d'un mutant du MEN, dont le plus courant est le mutant thermosensible *cdc15-2*, entraîne un arrêt spécifique des cellules pré-cytodiérèse. Les chromosomes sont alors condensés et le fuseau mitotique allongé au maximum, juste avant sa dépolymérisation (Baro et al., 2017; Lopez et al., 2015; Varela et al., 2009). Ceci montre que les deux vagues de relâche de Cdc14 sont indépendantes. La première vague ne peut donc pas être amplifiée suffisamment jusqu'à promouvoir la cytodiérèse sans une activation spécifique du MEN.

Il est donc possible d'obtenir un blocage spécifique en télophase et un retour dans le cycle d'une haute synchronie en utilisant des mutants du MEN (Rosebrock, 2017).

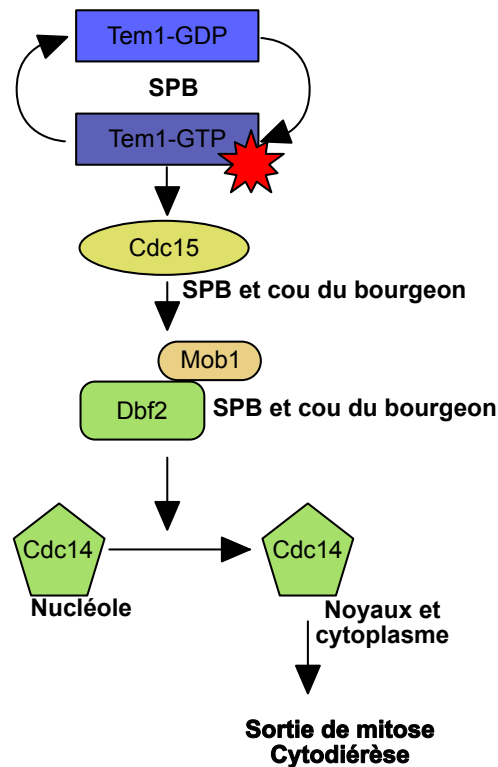


Figure 16 Le MEN

Cascade de kinases déclenchée par le passage de Tem1 fixé au SPB, au travers du cou du bourgeon. La relâche de la deuxième vague de Cdc14 entraîne la ainsi sortie de mitose (Bhavsar-Jog and Bi, 2017).

7) Un point de contrôle de l'abscission ?

Le phénotype « cut » chez *S. pombe* a été décrit après qu'il ait été observé que les masses nucléaires mal ségrégées étaient cassées par la cytotdiérèse (Hirano et al. 1986). Chez *S. pombe*, il est depuis largement admis que les chromosomes peuvent être sectionnés par la cytotdiérèse. L'effecteur de la cassure reste cependant inconnu.

Un mécanisme de régulation temporelle coordonnant la fermeture des septa et la ségrégation des chromosomes pourrait toutefois éviter que le génome ne soient endommagé à cause d'une fermeture précoce.

Ce mécanisme par lequel la présence de chromatine au site de constriction serait signalée et conduirait à un blocage de l'abscission a été proposé et nommé *NoCut* ou « checkpoint d'abscission » (Norden et al., 2006).

Cette inhibition dépendrait de la kinase Ip11^{Aurora B} qui, si elle est ciblée artificiellement à la chromatine retarde spécifiquement l'abscission (Mendoza et al., 2009).

Ce checkpoint a été vu dans des cas de défaut de condensation, en l'absence de topoisomérase, en cas de défaut de disjonction des chromatides sœurs (Amaral et al., 2017; Mendoza et al., 2009; Norden et al., 2006). Toutefois, son existence a été contestée dans toutes ces situations (Baxter and Diffley, 2008; Cuylen et al., 2013; Quevedo et al., 2012). Malgré cette contradiction, le même groupe ayant proposé *NoCut* a confirmé un délai provoqué par un défaut de condensation ou de topoisomérase. Cependant, ils admettent que les ponts de chromatine finissent par être sectionnés après ce délai (Amaral et al., 2016, 2017). De plus, ce groupe propose que *NoCut* soit également déclenché par un défaut de réplication provoqué par un arrêt prolongé en phase S suite à une exposition à l'hydroxyurée (Amaral et al., 2016). *NoCut* permettrait alors aux ponts formés par la ségrégation de chromatides mal répliquées, d'être résolus avant d'être cassés par l'abscission (Amaral et al., 2016).

Il est important de noter que la présence d'un pont induit par un dicentrique n'active pas *NoCut* (Amaral et al., 2016). La raison pour laquelle un pont de chromatine formé par un dicentrique et un pont de chromatine formé par une chromatide mal ségrégée sont reconnus différemment reste mystérieuse.

En plus d'Aurora B, les deux protéines *Aniline-like* Boi1 et Boi2 sont également requises pour un blocage de l'abscission par l'activation de *NoCut*. Toutefois le double mutant *boi1Δ boi2Δ* dans lequel les expériences ont été faites est normalement inviable (Bender et al., 2006). La souche utilisée dérive de la sélection d'au moins un suppresseur correspondant à une mutation du gène *EXO70* (Masgrau et al., 2017). Exo70 est un composant essentiel de l'exocyste qui participe à la formation des septa (Finger and Novick, 1997). Il est donc possible que le suppresseur Exo70 soit également présent dans les souches utilisées pour observer l'activation de *NoCut* et qu'il provoque par lui-même un premier défaut de septation. La cytodièrese dans ces souches étant donc déjà partiellement défaillante, la présence d'ADN mal ségrégué au point de constriction dans ces cellules pourrait alors simplement aggraver ce défaut et créer un retard sévère d'abscission.

Article :

Condensin-Mediated Chromosome Folding and Internal Telomeres
Drive Dicentric Severing by Cytokinesis

Condensin-Mediated Chromosome Folding and Internal Telomeres

Drive Dicentric Severing by Cytokinesis

Thomas M. GUÉRIN¹, Claire BÉNEUT¹, Natalja BARINOVA¹, Luciana LAZAR-STEFANITA², Romain KOSZUL², Karine DUBRANA³ and Stéphane MARCAND^{1*}

1. Commissariat à l'énergie atomique et aux énergies alternatives, Institut de Biologie François Jacob, Laboratoire Télomères et Réparation du Chromosome, INSERM UMR 967, Paris-Saclay, France

2. Institut Pasteur, Department Genomes and Genetics, Groupe Régulation Spatiale des Génomes, CNRS UMR 3525, Paris, France

3. Commissariat à l'énergie atomique et aux énergies alternatives, Institut de Biologie François Jacob, Laboratoire Instabilité Génétique et Organisation Nucléaire, INSERM UMR 967, Paris-Saclay, France

* Lead contact. E-mail: stephane.marcand@cea.fr

Running title: Protein-Bound Arrays, Condensation and Septation Dictate where Dicentrics Break

Abstract

Telomeres ensure chromosome end stability. Failure to do so would lead to chromosome end fusions and the formation of unstable dicentric chromosomes, a threat to cell viability and a source of extensive mutagenesis. In *Saccharomyces cerevisiae*, dicentrics formed by telomere fusion preferentially break at the fusion. This unexplained process allows the recovery of a normal karyotype and protects telomeres from the detrimental consequences of accidental fusions. Here we address the molecular basis of this rescue pathway. We observe that simple tandem arrays tightly bound by the telomere factor Rap1 or a heterologous high-affinity DNA binding factor are sufficient to establish breakage hotspots, mimicking telomere fusions within dicentrics. We also show that condensins generate forces sufficient to rapidly pull and refold dicentrics prior breakage by cytokinesis and are essential to the preferential breakage at telomere fusions and other Rap1-bound arrays, which delimit insulated chromosomal domains. Thus, the rescue of fused telomeres results from a condensin- and Rap1-driven chromosome conformation that favours fusion entrapment where the septum closes. These results lead us to propose that Rap1-bound telomere sequences stall loop-extrusion by condensins. In addition, this work provides a new and direct way to monitor condensin activity on chromatin in live cells.

Introduction

Dicentric chromosomes, – i.e. chromosomes with two centromeres –, are unstable structures that stem from erroneous DNA repair events or abnormal epigenetic neocentromere formation. When dicentrics are formed prior to replication, the two centromeres on the same sister chromatid are pulled towards either the same spindle pole or opposite poles with equal probability (Figure 1A). Migration to the same pole propagates the dicentric chromosome intact to the next generation whereas migration to opposite poles generates anaphase bridges, which often result in chromosome breakage (Hill and Bloom, 1989; McClintock, 1941; Thrower and Bloom, 2001). This breakage does not occur in anaphase but after mitotic spindle disassembly and the onset of cytokinesis (Hong et al., 2018; Hou and Cooper, 2018; López et al., 2015; Maciejowski et al., 2015; Mohebi et al., 2015; Pampalona et al., 2016).

The newly broken ends can cause cell death or be subjected to DNA repair processes. Because they can enter into breakage-fusion-bridge cycles and lead to chromothripsis, dicentrics are a threat to cell viability and a source of extensive genome instability and mutagenesis (Beyer and Weinert, 2016; Maciejowski et al., 2015; McClintock, 1941). In normal contexts, dicentrics are rare. First, DNA repair is usually accurate enough to avoid chromosome translocations (Bétermier et al., 2014). Second, nonhomologous end-joining (NHEJ) is inhibited at telomeres, preventing telomere fusions that would generate dicentrics (Benarroch-Popivker et al., 2016; Lescasse et al., 2013; Reis et al., 2012; van Steensel et al., 1998). Finally, mechanisms ensure that epigenetic centromeres do not form at the wrong

locations (Müller and Almouzni, 2017). However, there are contexts where dicentrics occur more frequently. The first described is exposure to ionizing radiations (Muller and Altenburg, 1930). Generating multiple and simultaneous double-strand breaks, they favour erroneous NHEJ repair between breaks, giving rise to dicentric and acentric chromosomes at a remarkably high frequency (Kaddour et al., 2017; M'kacher et al., 2014; Suto, 2016). Human oncogenesis is another context where dicentric occurrence is prevalent. In cells having bypassed senescence, extensive telomere shortening results in frequent end-to-end fusions and dicentric chromosomes. This leads to transient but substantial genome instability from which can emerge malignant cells with mutations and gene copy number alterations allowing an escape from the controls preventing cancer (Maciejowski and de Lange, 2017).

Some cells can circumvent the genome instability that would otherwise result from telomere fusions. In *Saccharomyces cerevisiae*, dicentrics formed by telomere fusions most often break at the fusion. This process restores the parental chromosomes and allows cell lineages to recover from fusions with a normal karyotype (Pobiega and Marcand, 2010). Thus, a backup rescue pathway can protect cells from the adverse consequences of accidental telomere fusions. Our current understanding of telomeres does not provide obvious hypotheses to explain how telomere fusions in dicentrics are more prone to breakage.

In *S. cerevisiae*, dicentrics lacking telomere fusion break with greater likelihood near centromeres (López et al., 2015; Song et al., 2013). Whether it occurs at telomere fusions, at pericentromeres or somewhere else between centromeres, the severing of dicentrics does not occur in

response to chromatin stretching. Instead, dicentric breakage requires cytokinesis (López et al., 2015). Preferential breakage at pericentromeres or telomere fusions may result from their preferential entrapment by the closing septum. In agreement with this model, dicentric centromeres rapidly converge toward each other after spindle disassembly and the onset of cytokinesis, a movement bringing the centromeres and the intercentromeric chromatin in close proximity to the plane of cytokinesis (López et al., 2015). What drives this movement was unknown.

Here we addressed what causes the preferential breakage of dicentrics at telomere fusions and the rapid movement of dicentric centromeres following the onset of cytokinesis. We found that simple arrays bound by the telomere-binding factor Rap1 or the heterologous DNA-binding factor lacI are sufficient to mimic the breakage hotspot established by telomere fusions within dicentrics. Condensins drive the dicentric-induced post-anaphase recoiling and are essential for dicentric breakage at centromere-proximal regions. Preferential breakage at Rap1-bound arrays also requires condensin. In addition, Rap1/lacI-bound arrays delimit insulated chromosomal domains in late anaphase. Together these results show that preferential breakage at telomere fusions is the consequence of a condensin-driven chromosome conformation that is imposed by the tight binding of Rap1 to DNA and favours entrapment at the completion of cytokinesis.

Results

Dicentrics preferentially break at internal telomeres

Telomere fusions shown to be more prone to breakage within dicentrics are head-to-head fusions of telomere repeats flanked by the native subtelomere sequences (Pobiega and Marcand, 2010). The palindromic structure of the fusion, the telomere and subtelomere sequences as well as factors bound to them could be important in creating a breakage hot spot. We initially asked whether non-palindromic internal telomere repeats within a dicentric chromosome are also more prone to breakage.

To study dicentric breakage, we created conditional dicentric chromosomes with a conditional centromere (Hill and Bloom, 1989; López et al., 2015). In short, the native centromere of chromosome 6 (*CEN6*) is flanked by two galactose-inducible promoters. On galactose, *CEN6* is mostly inactive and detached from the kinetochore microtubule. When transcription is turned off by glucose, the centromere is rapidly reattached to a microtubule and its function is restored (Tanaka et al., 2005). Fusing by homologous recombination the end of chromosome 6 right arm (6R) to the end of chromosome 7 left arm (7L) generates 6+7 dicentrics whose centromeres are 600 kb apart (Figure 1B). These conditional dicentrics are stably propagated as long as *CEN6* is inactivated by galactose. First, we tested two configurations of 6+7

dicentrics: one lacking internal telomere repeats and one with 300 bp of direct (non-palindromic) TG₁₋₃ telomere repeats

inserted at the junction between the two fused chromosomes. Both

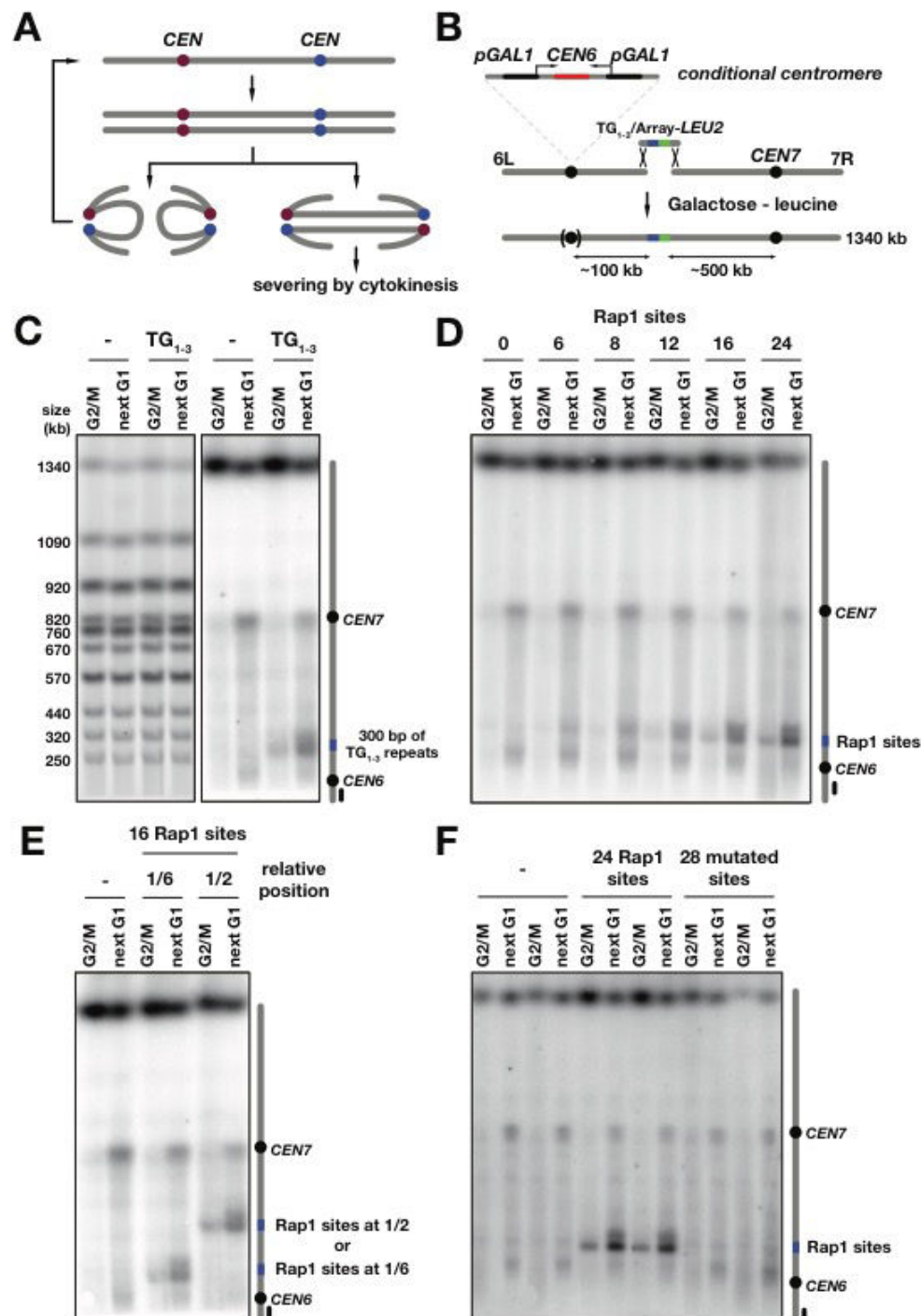


Figure 1. Preferential dicentric breakage at Rap1 bound tandem arrays. (A) Segregation of a dicentric formed in G1. In Anaphase, the two centromeres of each sister chromatid can migrate to the same pole, thus propagating the dicentric intact to the next generation in the two offspring. Alternatively, the centromeres of each sister chromatid can migrate to opposite poles, forming two anaphase bridges, which are severed at cytokinesis. (B) Fusion of chromosome 6 right arm to the left arm of chromosome 7 by homologous recombination. (C) Preferential breakage at internal telomere repeats. Cells having a 6+7 dicentric, with or

without 300 bp of telomeric repeats inserted at the junction between chromosomes 6 and 7, were grown exponentially in galactose-containing medium, synchronized in G1 with α -factor, released in glucose-containing medium and either blocked in G2/M with nocodazole (G2/M) or allowed to proceed through mitosis to be blocked in the next G1 with α -factor (next G1). Chromosomes were separated by PFGE (left panel, gel red labelled) and probed with a fragment from chromosome 6 left arm (right panel). (D) Preferential breakage at internal arrays of Rap1 binding sites. The experiment was performed as above with cells possessing a 6+7 dicentric with 0 to 24 Rap1 binding sites in tandem inserted at the junction between chromosomes 6 and 7. (E) Preferential breakage at Rap1 binding sites inserted in-between centromeres. Cells possess a 6+7 dicentric with no inserted Rap1 site (-), 16 Rap1 binding sites inserted at the junction between chromosomes 6 and 7 (1/6) or 16 Rap1 binding sites inserted within chromosome 7 left arm (1/2). (F) Lack of breakage at mutated Rap1 sites. Cells possess a 6+7 dicentric with no inserted Rap1 site (-), 24 Rap1 binding sites (24) or 28 mutated sites unable to bind Rap1 (28 mut.). Both tandem arrays are inserted at the junction between chromosomes 6 and 7. Rap1 site: GGTGT(C/A)TGGGTGTA. Mutated site: GGAGT(C/A)TGGGAGTA.

dicentrics have lost the native 7L subtelomere and kept the native 6R subtelomere.

To look at dicentric breakage during a single cell cycle, cells grown in the presence of galactose were synchronized in G1 and released from the arrest in a glucose-containing medium. Cells were either blocked at the G2/M transition or allowed to progress through mitosis until they were blocked again in the next G1. Intact and broken chromosomes were separated by pulse-field gel electrophoresis (PFGE) and hybridized with a probe from one side of the dicentric. In the absence of internal telomere repeats, pericentromeres are the preferred breakage positions (Figure 1C), as previously observed (López et al., 2015). The insertion of direct telomere repeats is sufficient to create a hot spot of breakage (Figure 1C). This shows that the head-to-head palindrome formed by the fusion is not essential in favouring dicentric breakage. Note that in cells arrested prior to mitosis (G2/M), a fraction of the dicentric molecules are already broken at the position where internal telomeres are inserted. This background of breakage stems mostly from residual *CEN6* activity in a galactose-

containing medium (Supplemental Figure S1) (Pobiega and Marcand, 2010).

Dicentrics preferentially break at Rap1-bound tandem arrays

Yeast TG₁₋₃ telomere repeats are arrays of high affinity binding sites for the Rap1 protein (Wellinger and Zakian, 2012). To assess whether Rap1 binding in tandem is what creates a dicentric breakage hot spot, we inserted tandem arrays of 6 to 24 Rap1 binding sites within a 6+7 dicentric lacking both 6R and 7L subtelomere sequences. We chose high-affinity sites with close spacing known to mimic Rap1 binding density at native telomere sequences (14 bp site with alternate spacers of 1 and 6 bp) (Grossi et al., 2001; Williams et al., 2010). As shown in Figure 1D, dicentric breakage occurs preferentially at multiple Rap1 binding sites. A tandem of 6 sites is sufficient to pass the detection threshold. Increasing the number of Rap1 sites strengthens breakage at the array and concomitantly weakens breakage at pericentromeric regions. Thus, tandem arrays of high affinity Rap1 binding sites are sufficient to establish a hot spot of breakage within a dicentric in the absence of adjacent subtelomere sequences.

To test whether the position of the Rap1 sites within a dicentric influences their ability to establish a breakage hot spot, we compared the impact of a 16 Rap1 binding

sites array inserted closer to one centromere (1/6) or halfway between the centromeres within chromosome 7 left arm (1/2). As shown in Figure 1E,

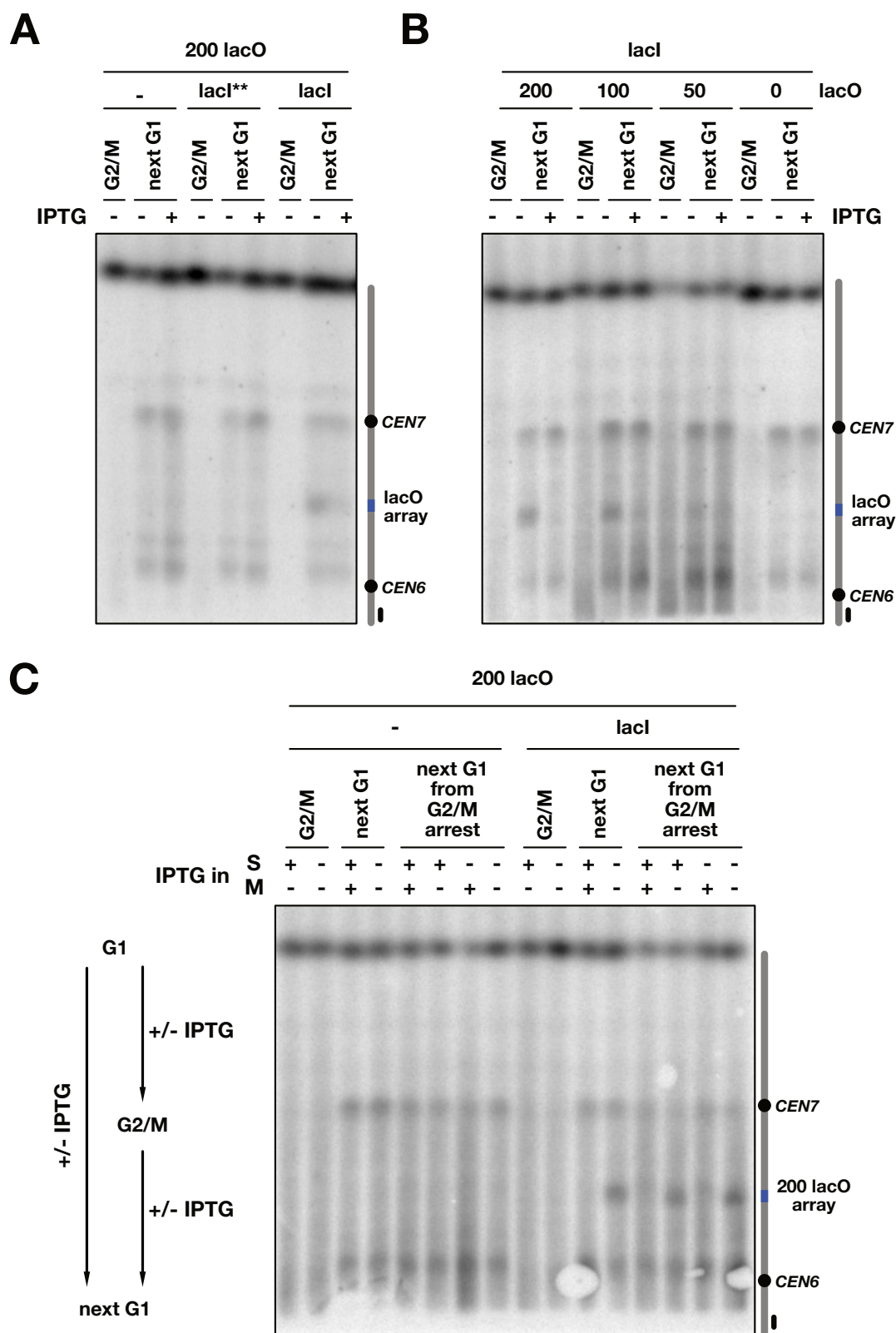


Figure 2. Preferential dicentric breakage at lacO arrays bound by lacI. (A) Breakage at a lacO array bound by lacI. Cells proceeded through mitosis with or without 2mM IPTG. Cells possess a 6+7 dicentric with 200 lacO sites inserted within chromosome 7 left arm. Low-affinity lacI** and high-affinity lacI are expressed from an integrated plasmid. (B) Breakage at a lacO array depends on the array size. Cells expressing lacI possess a 6+7 dicentric with 0 to 200 lacO sites. (C) Breakage at a lacO array requires lacI binding during progression through mitosis. Cells possessing a 6+7 dicentric with 200 lacO sites and either an empty vector (-) or a integrated plasmid expressing lacI (lacI) were released in glucose from G1 with or without IPTG and either blocked in G2/M with nocodazole (G2/M) or allowed to proceed to the next G1 (next G1). Cells blocked in G2/M were released with or without IPTG and blocked in the next G1 (next G1 from G2/M arrest).

breakage frequencies at these inserted positions are indistinguishable. This shows that the ability of Rap1 sites to establish a breakage hot spot is largely independent of the surrounding chromatin environment.

Next, we asked whether Rap1 binding to its sites is essential to establish a breakage hot spot. Since Rap1 is also a transcription factor essential for viability (Candelli et al., 2018; Challal et al., 2018; Knight et al., 2014; Kubik et al., 2018; Lickwar et al., 2012), we used two complementary approaches to address this issue. First, we tested a tandem array of 28 mutated sites with base changes disrupting the Rap1 consensus binding site, while conserving its G-richness. This array is unable to establish a hot spot of breakage (Figure 1F). Second, we assessed where a dicentric with internal telomere repeats breaks when the Rap1 level is reduced approximately 10-fold with the help of an inducible degron (Supplemental Figure S2A). A lower Rap1 level decreases breakage specifically at internal telomere repeats, not near centromeres (Supplemental Figure S2B). Together these results indicate that tandem arrays bound by Rap1 are sufficient to establish a breakage hot spot within a dicentric chromosome.

Dicentrics preferentially break at lacO arrays bound by lacI

We then asked how Rap1 can impact dicentric breakage. At telomeres, Rap1

recruits the Rif1, Rif2, Sir3 and Sir4 proteins, which are important for telomere protection and telomere length homeostasis (Wellinger and Zakian, 2012). In cells lacking one of these proteins or the associated protein Sir2, internal telomere repeats still generate a dicentric breakage hot spot (Supplemental Figure S3), showing that they are not essential to this process. Since Sir2, Sir3 and Sir4 are essential yeast heterochromatin components, it also rules out heterochromatin as the structure favouring dicentric breakage at internal telomere repeats.

A hallmark of Rap1 is to bind its sites with a high affinity ($K_D \sim 20$ pM) (Matot et al., 2012; Williams et al., 2010). If tight Rap1-DNA interaction is sufficient to establish a dicentric breakage hot spot, its effect should be mimicked by other tight DNA binders. We tested this hypothesis with a heterologous DNA-binding protein, lacI, known for its high affinity to its site lacO ($K_D \sim 10$ pM (Falcon and Matthews, 1999)). Arrays of lacO were inserted within a dicentric. As shown in Figure 2A, an unbound array of 200 lacO or the same array bound by a mutant lacI with a reduced DNA binding affinity (lacI** (Dubarry et al., 2011), see materials and methods) do not impact dicentric breakage. By contrast, the same array of 200 lacO bound by a lacI protein with high DNA binding affinity (lacI) establishes a breakage hot spot. Its

intensity is severely diminished by addition of isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG), which lessens lacI affinity to its site. Reducing the size of the lacO array also weakens the hot spot (Figure 2B). Finally, in the absence of lacO, lacI has no impact on dicentric breakage. Thus, a tandem array tightly bound by a heterologous protein is sufficient to mimic the ability of multiple Rap1 binding sites to favour dicentric breakage nearby. This suggests that the key Rap1 property in this process is to tightly bind its sites in tandem.

How tight protein-DNA interactions may directly favour dicentric breakage is unclear. They might be important at the time of breakage at the end of cytokinesis. They may also be a challenge for replication (Dubarry et al., 2011; Goto et al., 2015), leaving a mark in S phase that later influences where dicentrics are severed by cytokinesis. Inhibiting the lacI-lacO interaction with IPTG offers an opportunity to test the latter hypothesis. As shown in Figure 2C, when IPTG is added after S phase to cells released from a G2/M arrest, preferential breakage at the lacO array is lost. By contrast, when cells are exposed to IPTG during S phase only until G2/M, breakage at the lacO array during mitosis is as frequent as in cells unexposed to IPTG. These results indicate that lacI interaction is needed for the establishment of a dicentric breakage hot spot at a lacO array during progression through mitosis and not during progression through S phase. Thus, replication challenges at the bound array are unlikely causes for preferential breakage within dicentrics. The question remains as to what structure created by protein-bound tandem arrays favours breakage. To address this issue, we next asked which step of cytokinesis is essential to severe dicentrics.

Dicentric breakage only requires septation, not the actomyosin ring contraction or the following cell separation

During yeast cytokinesis, the contraction of an actomyosin ring guides septation. Once contracted to a 100-200 nm diameter, the ring disassembles to allow the further growth of the septum to fill the remaining hole (Bi and Park, 2012; Onishi et al., 2013; Weiss, 2012). Our previous observations by transmission electron microscopy showed that, in cells with a dicentric, the closing septum can pinch the nuclear envelope (López et al., 2015). This can also be seen at lower resolution by time-lapse microscopy in live cells where histones and the plasma membrane are labelled with fluorophores (Figure 3A). In cells where dicentric anaphase bridges are formed, the two nuclei are connected and are abnormally close to each other at the time of ingression and separate shortly after. Although diffraction prevents a precise definition of the timing of abscission completion, the two events seem coincident with our time resolution. This (and similar observations by (Amaral et al., 2016)) further suggests that breakage is induced after ring disassembly by septum closure. Therefore, dicentric breakage should only require septation but not the preceding ring contraction or the following cell separation. To test this prediction, we first looked at breakage in a context where cytokinesis is independent of the actomyosin ring. In the absence of the myosin Myo1, the actomyosin ring is not assembled and septation is significantly impaired. Myo1 depletion with an auxin-inducible degron (*myo1-AID* + IAA) results in a sharp

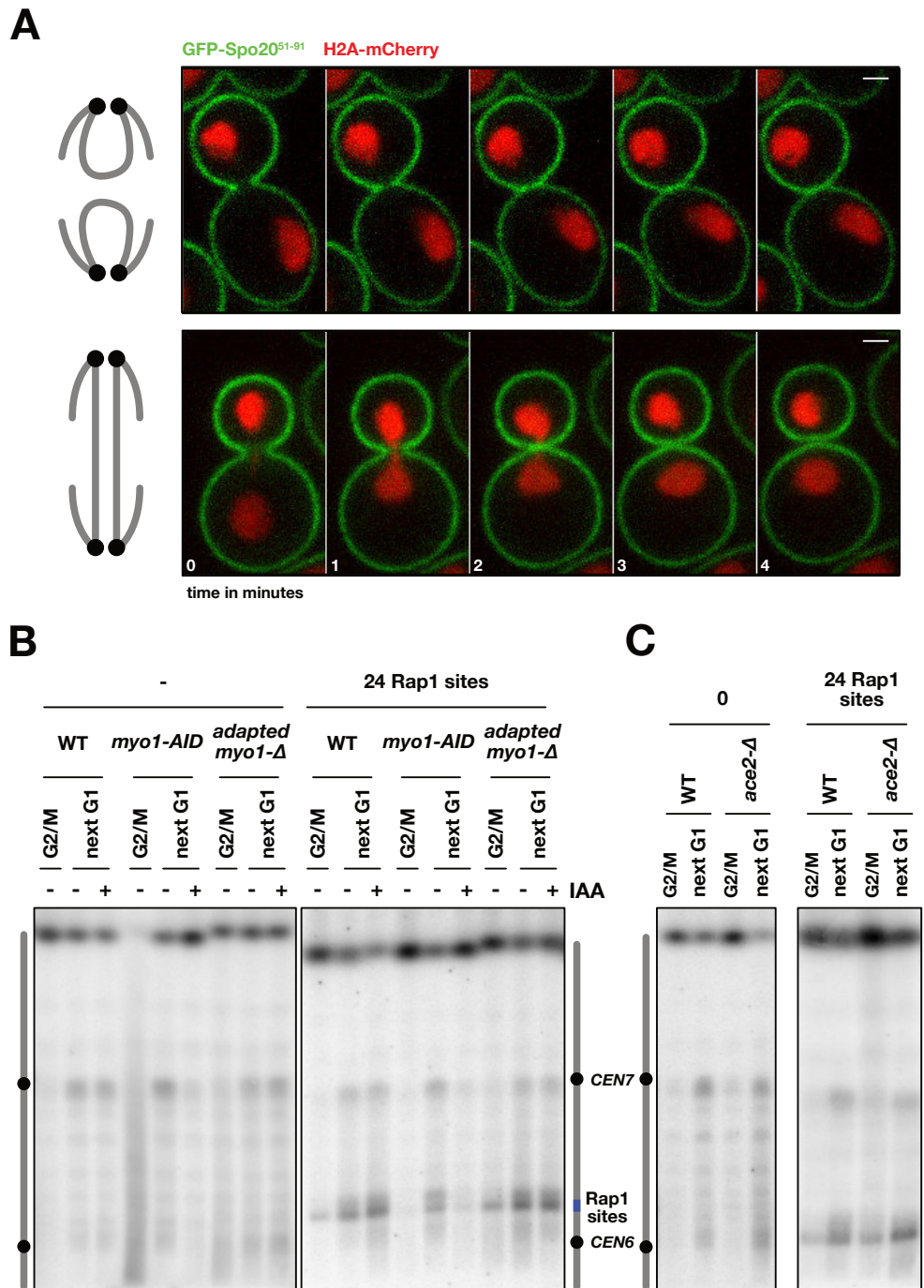


Figure 3. Dicentric breakage by septation. (A) Dicentric-induced chromatin pitching by septation. Cells possessing a dicentric 6+7 without inserted tandem array were grown exponentially at 30°C in galactose-containing medium and switch to glucose 30 minutes before imaging at 30°C. One image taken every minute. Plasma membrane is labelled with TTYeGFP-Spo20⁵¹⁻⁹¹ and nucleosomes with a HTA1-mCherry tag. Scale bar, 1μm (pixel size 52 nm). The scheme on the left represents the chromatids (grey) conformation that does not create (upper image) or creates (lower image) an anaphase bridge. (B) Dicentrics still break in cells carrying out septation without a contractile actomyosin ring. WT, *myo1-AID* and adapted *myo1-Δ* cells possessing a 6+7 dicentric with no inserted Rap1 site (-) or an array of 24 Rap1 binding sites inserted at the junction between chromosomes 6 and 7 (24 Rap1 sites) proceeded through mitosis with or without 2mM IAA. (C) Dicentrics still break in cell-separation defective cells. WT and *ace2-Δ* cells possessing a 6+7 dicentric with no inserted Rap1

site (-) or an array of 24 Rap1 binding sites inserted at the junction between chromosomes 6 and 7 (24 Rap1 sites) proceeded through mitosis with or without 2mM IAA.

decrease in dicentric breakage at pericentromeres (Figure 3B left panel, as reported previously (López et al., 2015)) and at a Rap1-bound tandem array (Figure 3B right panel). Cells completely lacking Myo1 (*myo1-Δ*) grow very poorly due to frequent failure at cytokinesis. Upon continuous selection, they acquire suppressor mutations that restore an efficient and timely cytokinesis through the growth of a compensatory septum in the absence of a contractile actomyosin ring (Bi et al., 1998; Rancati et al., 2008). Conditional dicentrics were created in these adapted *myo1-Δ* cells carrying out cytokinesis only through septation. As shown in Figure 3B (left and right panels), dicentric breakage occurs in *myo1-Δ* cells as in wild-type cells. Therefore, septation is sufficient to sever dicentrics and actomyosin ring contraction can be bypassed.

Next, we asked whether cell separation contributes to dicentric breakage. Following abscission, degradation and rearrangement of polysaccharide chains within the septum allow cell separation. The transcription factor Ace2 activates the expression of genes encoding septum destruction enzymes carrying out this process. Its absence prevents or severely delays cell separation (Voth et al., 2005; Weiss, 2012). In cells lacking Ace2, dicentrics break as in normal cells (Figure 3C, left and right panels). We conclude that breakage does not need the post-abscission septum remodelling leading to cell separation. Together these results further support the hypothesis that septum closure severs dicentrics.

Centromeres relocation to the bud neck and breakage near centromeres require condensin

Dicentric anaphase bridges cause a relocation of the spindle pole bodies (SPB, yeast's centrosome equivalent) and the centromeres toward the bud neck during septation (Amaral et al., 2016; López et al., 2015; Thrower and Bloom, 2001) (Figure 4A, bottom panel). This movement occurs relatively late during cytokinesis, often after actomyosin ring disassembly (López et al., 2015). Passive recoiling of the stretched chromatin bridges into a non-stretched state following mitotic spindle disassembly could be a cause of this relocation. Else, active chromatin compaction by condensin could also contribute to this process (Ganji et al., 2018; Lavoie et al., 2004; Lazar-Stefanita et al., 2017; Renshaw et al., 2010). To test condensin implication in dicentric centromere relocation, we created conditional dicentrics in cells carrying an auxin-inducible degron of Smc2, a SMC subunit of yeast condensin (Supplemental Figure S4).

First, we monitored SPBs movement during the mitosis that follows *CEN6* reactivation and auxin (indole-3-acetic acid or IAA) addition (Figure 4B, Supplemental Figure S5). As previously observed, in a wild type context, SPBs snap back towards each other at the end of furrow ingression in nearly half the cells with a dicentric, the fraction where anaphase bridges are formed. Interestingly, SPB snap back is often asymmetrical with one pole moving to the bud neck before the other (Supplemental Figure S6), suggesting that the movement trigger is an event that can impact one of the SPB earlier than the other (for instance an

early release from cell cortex attachment or a precocious recoiling in one nuclear lobe). In Smc2-defective cells, the frequency of dicentric-induced SPBs snap-back is markedly decreased ($p < 0.001$ χ^2) (Figure 4B). In cells without dicentric, Smc2 loss does not change the SPB dynamics.

Second, we tracked the position of one centromere in a dicentric using a lacO array inserted near *CEN7* and bound by a low-affinity GFP-lacI** mutant (Figure 4C). To estimate the relocation of the centromere toward the bud neck, we measured the shortest observed distance between the lacO array and the plan of cytokinesis after actomyosin ring contraction with a time resolution of 2 minutes. In wild type cells without dicentric this distance is in most cases larger than 1 μm , whereas in cells with a dicentric, it is frequently shorter than 1 μm (Figure 4D). When Smc2 is degraded, cells where the shortest distance passes below this threshold are less frequent ($p < 0.01$ χ^2). In other words, a condensin defect allows dicentric centromeres to remain away from the bud neck at the time of abscission. Together, these results show that condensins are required to the dicentric-induced relocation of the SPBs and the centromeres. Thus, this sudden movement likely results from an active chromatin compaction of the stretched chromatin bridges, a process dragging along the centromeres and the

attached SPBs towards the plane of cytokinesis prior breakage.

If breakage results from DNA entrapment at the bud neck when cytokinesis is completed, an inability to relocate centromeres nearby should prevent breakage in the pericentromeric regions. To test this prediction, we looked at breakage in Smc2-depleted cells. As shown in Figure 4E, condensin loss strongly reduces breakage near centromeres and concomitantly favours breakage in the middle part of the intercentromeric region. Since centromeres remain away from the bud neck in condensin defective cells, breakage frequency correlates with bud neck proximity when the septum closes. This indicates that chromatin can only be severed near where abscission takes place. It also shows that, in wild-type cells, breakage occurs after dicentric refolding.

Breakage near centromeres in shorter dicentrics still requires condensin

To further explore the importance of chromosome condensation on dicentric breakage positions, we addressed the severing of dicentrics with shorter distances between centromeres for which the dependence on condensin could be less pronounced. In this setting, a short fragment carrying a centromere is inserted in chromosome 6 at either 100 or

45 kb from the conditional *CEN6* centromere. In wild type cells, the ectopic

centromere establishes a hot spot of breakage indistinguishable from the hot

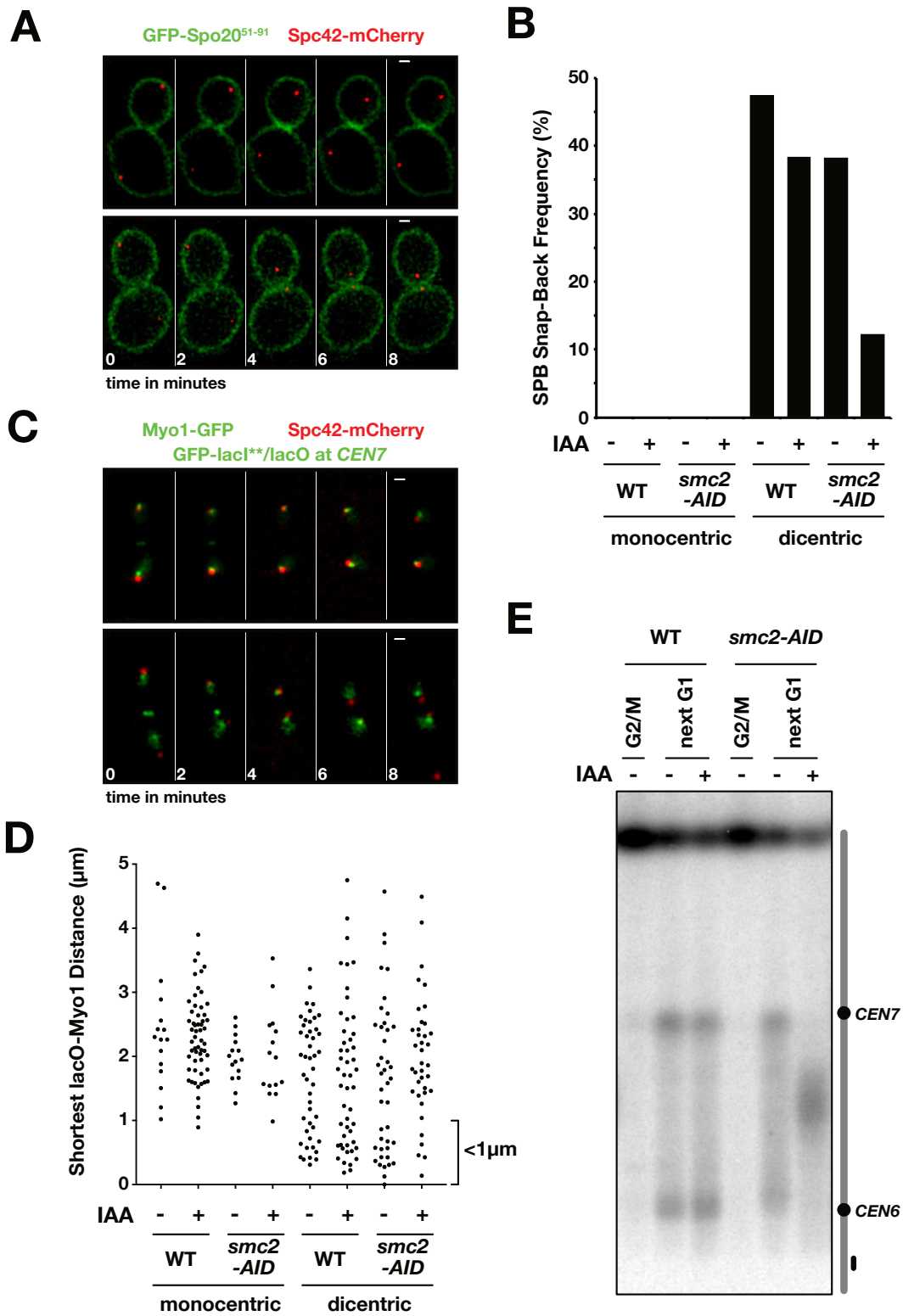


Figure 4. Centromere relocation to the bud neck and breakage near centromeres require condensin. (A) Example of dicentric-induced SPBs relocation to the bud neck shortly after cytokinesis onset. Wild-type cells possessing a 6+7 dicentric without inserted tandem array were grown in galactose-containing medium and switched to glucose 30 minutes before imaging at 30°C. One image taken every two minutes. Plasma membrane is labelled with TTyGFP-Spo20⁵¹⁻⁹¹ and the SPBs with a Spc42-mCherry tag. Scale bar, 1µm (pixel size 65 nm). Upper panel: example of normal (monocentric-like) SPBs dynamics during septation. Lower panel: example of dicentric-induced SPBs snap-back during septation. (B) Condensin depletion reduces the frequency of the dicentric-induced SPBs snap-back. TTyGFP-Spo20⁵¹⁻⁹¹ Spc42-mCherry wild-type and *smc2-AID* cells possessing a dicentric 6+7 were grown in galactose-containing medium and switch to glucose 30 minutes with or without 2mM IAA before imaging at 30°C. Monocentric cells were directly imaged in glucose-containing medium with or without 2mM IAA. SPBs were considered to have snapped back when the distance between the two SPBs got lower than 2 µm after ingression onset. Data from individual cells are showed in Supplemental figure S4. (C) Example of dicentric-induced centromere relocation to the bud neck shortly after cytokinesis onset. Wild-type cells possessing a 6+7 dicentric were imaged as in A. The contractile actomyosin ring is labelled with a Myo1-GFP tag, the SPBs with a Spc42-mCherry tag and the *CEN7* centromere with a lacO array inserted ~15 kb from *CEN7* and bound by a low-affinity GFP-lacI^{**}. Upper panel: example of normal (monocentric-like) centromere dynamics. Lower panel: example of dicentric-induced centromere relocation. (D) Condensin depletion allows dicentric centromeres to remain more often away from the bud neck after ingression onset. Wild-type and *smc2-AID* cells either monocentric or possessing a 6+7 dicentric were imaged as in B. For each condition, the shortest distance between the lacO spots and the position of Myo1 reached during the four minutes following actomyosin ring disassembly is plotted. (E) Breakage near centromeres require condensin. Wild-type and *smc2-AID* cells possessing a 6+7 dicentric with no inserted tandem array proceeded through mitosis with or without 2mM IAA.

spot adjacent to native centromeres (López et al., 2015) (Figure 5A). In *smc2-AID* cells depleted of Smc2 by IAA addition, breakage positions move away from the centromeres toward the median part of the dicentrics. Interestingly, breakage at centromeres is less frequent in *smc2-AID* cells unexposed to IAA compared to wild type cells, indicating that condensin function is already partially impaired in non-induced conditions (a similar but less pronounced shift is noticeable with longer dicentrics, Figure 4E). In conclusion, condensin are essential to break in pericentromeric regions even when the

centromeres are relatively close to each other.

Preferential breakage at Rap1 sites requires condensin

We then asked whether preferential breakage at a Rap1-bound tandem array requires condensin. When Rap1 sites are inserted closer to one of the centromeres (relative position 1/6, intercentromeric distance 600 kb), Smc2 loss strongly diminishes breakage frequency at the Rap1 sites (Figure 5B). This indicates that condensins are essential to the establishment by Rap1 of a breakage hot spot, at least when the Rap1 sites are off-centre. However, Rap1-bound arrays could remain a breakage hot-spot in condensin-defective cells when located within the middle part of the intercentromeric region where breakage now mostly occurs. Therefore, we next tested if a Rap1-bound tandem array located within this middle region is still preferentially severed in the absence of condensin.

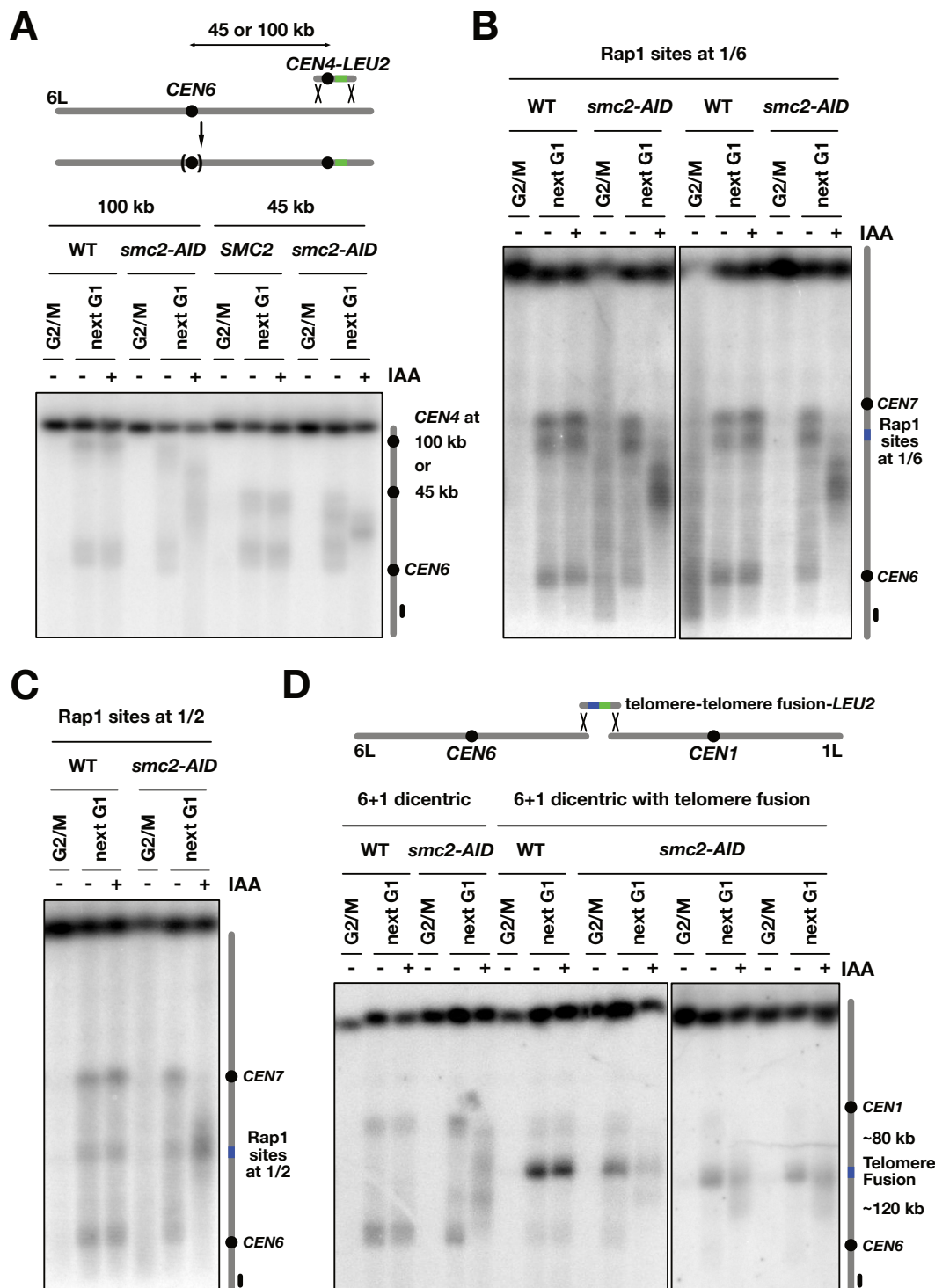


Figure 5. Preferential breakage at the pericentromeres of shorter dicentrics and at tandem Rap1 sites require condensin. (A) Condensin loss displaces breakage positions away from centromeres in shorter dicentrics. Dicentrics were generated through *CEN4* insertion in chromosome 6 right arm by homologous recombination (López et al., 2015). Wild-type and *smc2-AID* cells possessing a dicentric with a *CEN6-CEN4* distance of 100 kb or 45 kb proceeded through mitosis with or without 2mM IAA. Chromosomes separated by PFGE were probed with a fragment from chromosome 6 left arm. (B) Breakage at off-centre Rap1 sites requires condensin. Wild-type and *smc2-AID* cells possessing a 6+7 dicentric with 8 Rap1 binding sites inserted within chromosome 7 left arm at ~100 kb from *CEN7* proceeded through mitosis with or without 2mM IAA. (C)

Breakage at centred Rap1 sites in the absence of condensin. Wild-type and *smc2-AID* cells possessing a 6+7 dicentric with 8 Rap1 binding sites inserted within chromosome 7 left arm at ~300 kb from *CEN7* proceeded through mitosis with or without 2mM IAA. Left and right panels: two independent experiments. (D) Breakage at a telomere fusion located within the median region of a dicentric requires condensin. Dicentrics were generated through a fusion of chromosome 6 right end and chromosome 1 right end by homologous recombination. Left panel: wild-type and *smc2-AID* cells possessing a 6+1 dicentric with or without a head-to-head telomere fusion inserted at the junction between chromosomes 6 and 1 proceeded through mitosis with or without 2mM IAA. The inserted telomere fusion contains ~400 bp of telomere repeats. Right panel: independent duplicates of the *smc2-AID* context with telomere fusion.

In cells where tandem Rap1 sites are inserted halfway between the centromeres of 6+7 dicentric (relative position 1/2), breakage positions relocate to the middle part of the intercentromeric region in response to condensin loss (Figure 5C). The overlap with the Rap1 sites conceals the change in breakage frequency that may occur at the Rap1 sites. To circumvent this limitation, we established a stronger hot spot in a shorter dicentric (Figure 5D). In this setting, chromosome 6 right arm is fused to the right arm of chromosome 1 with or without a cloned telomere fusion of ~400 bp at the junction. The distance between the fusion and *CEN6* or *CEN1* is ~120 kb and ~80 kb respectively. In wild-type cells, the telomere fusion establishes a strong breakage hot spot. In the absence of telomere fusion, breakage occurs more frequently in the pericentromeric regions and relocate to the middle part of the intercentromeric region in condensin-defective cells (Figure 5D). When the telomere fusion is present, condensin loss also causes a marked reduction of breakage at the fusion (Figure 5D). Thus, preferential breakage at a Rap1-bound array requires condensin even when the array is located within the median region where dicentrics break in condensin-defective cells.

Rap1 or lacI-bound arrays delimit insulated chromosomal domains

The preferential breakage at Rap1-bound arrays appears as the consequence of a propensity to be entrapped at the abscission site when cytokinesis is completed. Since this preferential entrapment is also condensin-dependent, it might be associated with a change in tri-dimensional chromosomal folding imposed by Rap1 binding. To test this hypothesis, we applied chromosome conformation capture (Hi-C) to cells arrested in late anaphase and asked whether Rap1- or lacI-bound arrays alter chromosome conformation.

We tested three situations: (i) a control strain with an unbound lacO array inserted in chromosome 7 left arm, (ii) a strain where the lacO array is bound by lacI and (iii) a strain with the unbound lacO array plus 16 Rap1 binding sites inserted at another position on the same chromosome (Figure 6A). The quantification of contact frequencies between DNA restriction fragments generates the corresponding contact map for each strain (Figure 6A, Supplemental Figure S7). Differences between pairs of maps were emphasized by computing their ratio (Lazar-Stefanita et al., 2017), with the colour-scale representing the variations in contact frequency for each bin (Figure 6B, Supplemental Figure S8). Overall, the intra- and interchromosomal contact patterns are similar between the strains except for chromosome 7 left arm where the arrays are inserted. The presence of lacI reduces the

contact frequencies between sequences positioned on each side of the lacO array. This *cis*-effect extends over ~60 kb. It impacts short-range intra-chromosomal contacts, i.e. the most frequent chromosomal contacts in the nucleus. A similar insulation was observed between the flanking regions of Rap1-bound array. Thus, tandem arrays bound with high affinity modify the local chromosome conformation and act as insulators establishing distinct chromosome domains. This organization may contribute to their preferential entrapment at the abscission site when they are located within dicentrics. Finally, the observed impact of high-affinity lacI on dicentric breakage and chromosome conformation further advocates the use of a low-affinity lacI allele when using lacO arrays to track chromosome mobility, as previously advised (Dubarry et al., 2011).

Discussion

This study shows that the preferential breakage of dicentrics at internal telomere sequences in yeast depends on condensin, septation and tight Rap1 binding. It addresses the molecular mechanism of a unique rescue pathway protecting cells from the detrimental consequences of telomere fusions. Furthermore, it has implications for our understanding of chromosome condensation and telomere function.

Condensin-driven dicentric recoiling

Dicentric anaphase bridges recoil just prior to breakage at the completion of cytokinesis (Figure 7A). Our findings reveal that this recoiling of stretched chromatin fibres requires condensin, the SMC protein complex dedicated to chromosome folding in mitosis (Cheng et al., 2015; Ganji et al., 2018; Gibcus et al., 2018; Kschonsak et al., 2017; Lazar-Stefanita et al., 2017; Nasmyth, 2017; Renshaw et al., 2010; Shintomi et al., 2017). This shows that condensin remains active until the end of mitosis and that extensive chromosome compaction by condensin is not restricted to the rDNAs in yeast, as originally thought (e.g. (Hirano, 2017)). It extends previous observations on condensin-dependent recoiling of yeast chromosome arms in early anaphase (Renshaw et al., 2010) and unambiguously shows that condensin can generate forces sufficient to pull and rapidly compact yeast chromatin severalfold *in vivo*. During anaphase, the elongated spindle and possibly the SPB attachment to the cell cortex oppose the condensation of dicentric bridges. Once these antagonists expire, compaction is restored through the same protein complex that condenses chromosome arms earlier in mitosis. This adaptability likely depends on the observed dynamic interaction between condensin and chromatin *in vivo*,

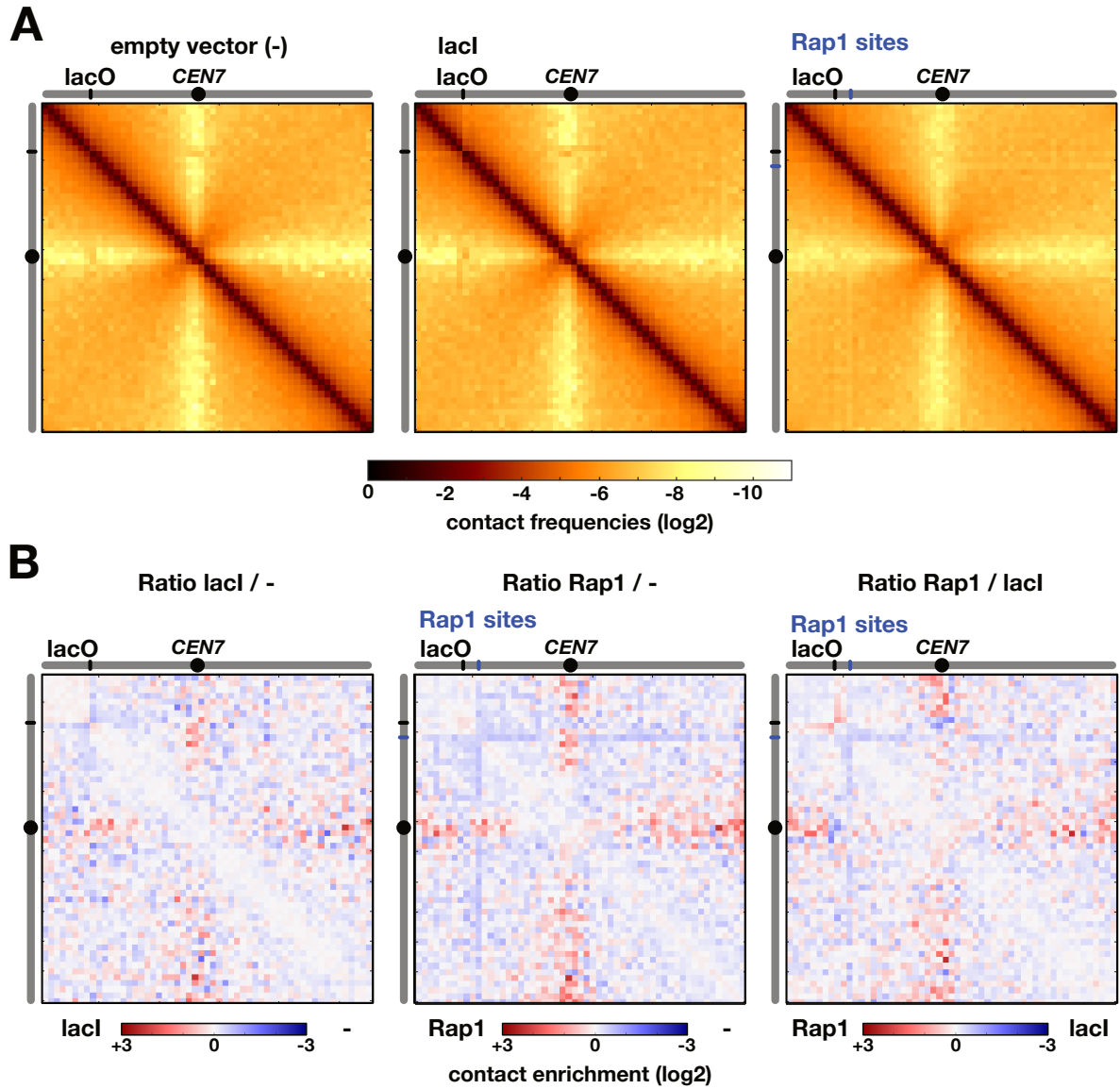


Figure 6. Rap1 and lacI-bound arrays delimit insulated chromosomal domains. (A) Monocentric *cdc15-2^{ts}* cells with a 200 lacO array inserted at position 166500 in chromosome 7 left arm and either an empty integrated vector (left panel), an integrated vector expressing high-affinity lacI (middle panel) or a tandem array of 16 sites Rap1 inserted at position 206707 in chromosome 7 left arm (right panel) were grown exponentially and synchronized in late anaphase at 36°C. After harvest, cells were treated as described in (Lazar-Stefanita et al., 2017). The contact maps shown cover chromosome 7. Bin size = 20 kb. The brown to yellow colour scale reflects high to low contact frequencies. (B) Log-ratio between each pair of maps for chromosome 7. The blue to red colour scale reflects the enrichment in contact in one population with respect to the other.

with frequent loading and unloading (Renshaw et al., 2010; Robellet et al., 2015; Thadani et al., 2018; Thattikota et al., 2018). From anaphase onset through the completion of cytokinesis, condensin-dependent chromatin loops may constantly form and come apart to establish a steady-state level of compaction. The recoiling of

dicentric bridges would therefore be a return to equilibrium that manifests an activity present on all chromosome arms at this time. *In vitro*, yeast condensin extrudes loops of naked DNA at rates up to ~1 kb per second (Ganji et al., 2018). At this rate, the observed recoiling of 600 kb dicentric

bridges in less than a few minutes (Figure 4) would require the combined action of only a few condensin molecules. However, loop extrusion velocity might be different on nucleosomal fibres. It may also be reduced by counteracting forces, as observed *in vitro* (Ganji et al., 2018). In addition, the initial stretching of chromatin may impact condensin recruitment and activity. Finally, condensin activation might be distinctively regulated at this late stage of mitosis compared to earlier in anaphase. For instance, it could depend on Ipl1^{Aurora B} (Lavoie et al., 2004). Dicentrics will be attractive tools to address these issues in live cells.

Interestingly, condensins acting on dicentric chromatids are strong enough to pull along the SPBs and through them the other chromosomes within the nucleus. Since this movement is relatively slow at a molecular scale (10-100 nm/s), the force needed to oppose the viscous drag is likely small (i.e. <1 pN) (Bloom, 2007). Therefore, it should not be a challenge to the kinetochore-microtubule connection, whose strength is estimated at ~10 pN (Miller et al., 2016) and is compatible with the known strength of single condensin molecules, which *in vitro* can oppose tension on DNA up to 2 pN (Ganji et al., 2018).

Preferential entrapment of pericentromeres and Rap1/lacI-bound arrays

Condensin loss prevents the relocation of centromeres to the bud neck at the end of septation (Figure 7B). As a consequence, it prevents the severing of dicentrics near centromeres and favours breakage in the median region, linking the spatial proximity to the bud neck at the time of abscission to the probability of being severed by

septation. Thus, dicentric breakage hot-spots result from a higher chance to be entrapped at the the abscission site.

When the closing septum entraps the pericentromeric region of a dicentric, the intercentromeric chromatin is entirely folded in one nuclear lobe (Figure 7A). A simple symmetry breaking could be sufficient to explain this end point. For instance, if condensin recruitment and loop extrusion are distributed randomly on chromatin and remain dynamic, small fluctuations in favour of one nuclear lobe could increase chromatin density and therefore the likelihood of further condensin recruitment and loop extrusion within it, establishing a positive feedback tending to fold the entire intercentromeric region in one nuclear lobe. Further chromosome translocation beyond the centromere could then be impeded by a bulky kinetochore unable to pass through the narrow hole left at the closing neck. The centromere connected to the kinetochore could also directly stall loop-extrusion by condensin. In both cases, it will favour the entrapment of the pericentromeric regions at the closing neck. Note that the proposed positive feedback should also promote full arm compaction of monocentric chromosomes in one nuclear lobe, thereby contributing to an efficient segregation in normal cells.

Can a similar model explain the frequent entrapment of Rap1 sites tandem arrays, including telomere fusions? Since Rap1 effect can be mimicked by the heterologous DNA binding factor lacI, its key attribute in this process is that it binds DNA tightly. In addition, the preferential entrapment of Rap1-bound arrays depends on condensin (Figure 7C). To explain Rap1/lacI impact on chromosome conformation and dicentric breakage, a

simple hypothesis is that Rap1/lacI-bound arrays stall loop-extrusion by condensin

(Supplemental Figure S9A). How condensin extrudes DNA is as yet

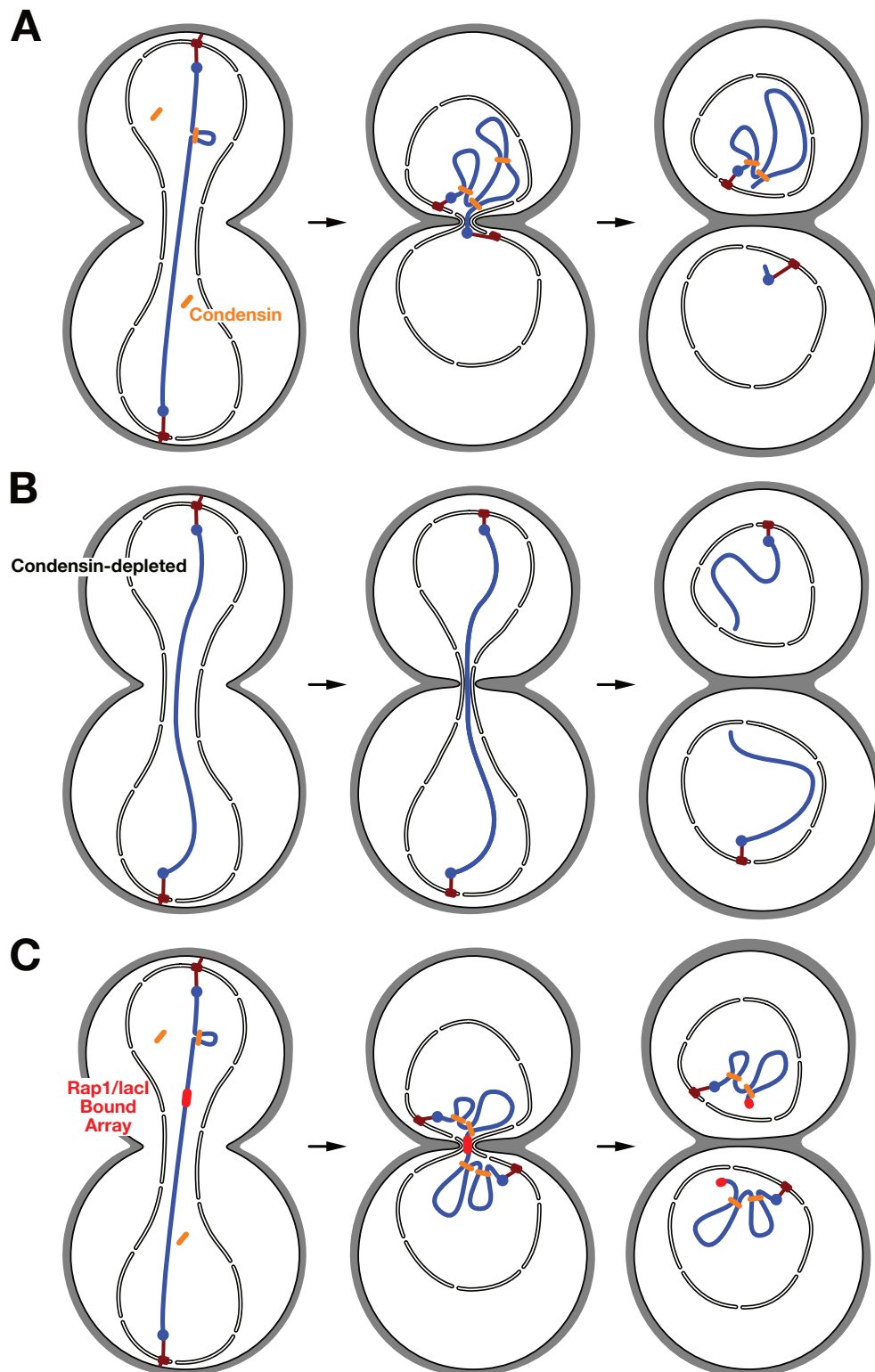


Figure 7: Models for dicentric dynamics, refolding and breakage in budding yeast. (A) Model for dicentrics preferentially severed at pericentromeres. Condensin molecules are in orange, chromatin in blue, SPBs and microtubules in brown, nuclear envelop and plasma membrane in black, cell wall and septum in grey. For simplicity, only one chromatid is drawn. The number and dynamics of the condensin molecules involved in

dicentric refolding are unknown. **(B)** Model for dicentrics in the absence of condensin. **(C)** Model for dicentrics preferentially severed at tandem Rap1/lacI bound arrays. The proposed scenarios are described in the discussion.

unknown but it likely proceeds through the recurrent formation of small intermediate loops, each one involving multiple condensin contacts with DNA and short-range DNA bending (Diebold-Durand et al., 2017; Ganji et al., 2018; Kschonsak et al., 2017; Marko et al., 2018) (Supplemental Figure S9B). Rap1/lacI bound on high-affinity sites in tandem with a close spacing may antagonize condensin-DNA interactions by steric hindrance, thereby impeding loop extrusion through the bound arrays. In addition, Rap1 binding on tandem arrays is known to stiffen DNA *in vitro*, generating stick-like structures that would be, for 16 sites in tandem, longer than condensin (~100 nm vs ~50 nm) (Le Bihan et al., 2013). This stiffening may also oppose the transient bending required for loop extrusion, although this too remains to be determined. In the context of a dicentric, condensin stalling at a bound tandem array would promote independent folding of each side of the array in the two nuclear lobes and consequently favour the entrapment of the array at the abscission site (Figure 7C). At native telomeres, condensin stalling may impact chromosome end segregation, a hypothesis that would be interesting to explore.

Breakage by septum closure

Once DNA is entrapped at the abscission site, how can cytokinesis sever

it? Actomyosin ring contraction and the post-abscission septum remodelling leading to cell separation are not needed for dicentric breakage. The severing of DNA is likely to result from the closing septum

pinching the nucleus and the dicentric bridges. Formally, a nuclease could be brought or activated by septation, although none of the ones we tested were required. Instead, we propose that physical forces are sufficient to break DNA entrapped at abscission. These forces can stem from the growth of the polysaccharide chains that build the septum, approximately a few tens of pN for each sugar monomer added (Cabib and Arroyo, 2013; Proctor et al., 2012). If dicentric bridges are transiently embedded into this dynamic and crosslinked network, the forces from the motion of individual chains could apply on the DNA molecules and be additive to some extent. This would generate shearing forces above the few hundred pN sufficient to break covalent bonds in the DNA backbone. In this scenario, dicentric bridges would rapidly shear off once the septum has closed on them. DNA severing by shearing forces could be ubiquitous in species with a septum such as budding yeasts, fission yeasts and bacteria, all known to break lagging chromatin at cytokinesis (Baxter and Diffley, 2008; Cuylen et al., 2013; Hirano et al., 1986; Hocquet et al., 2018; Quevedo et al., 2012; Sinha et al., 2017). In addition, shearing forces could break other accidentally entrapped macromolecules that could otherwise challenge abscission. Relying on physical forces seems an effective way to proceed since the lack of chemical specificity would allow this mechanism to act regardless of the nature of the hindrance. It will be thought provoking to explore these hypotheses.

Methods

Strains and plasmids

The strains used in this study are listed in Supplemental Table S1. To fuse the chromosome 6 right end to the chromosome 7 left end at *ADH4*, cells were transformed with XhoI NotI cut plasmid sp1003 (deleting the distal end of 6R from coordinate 268139 (López et al., 2015)), sp625 (including the entire 6R subtelomere without TG₁₋₃ repeats), sp626 (including the entire 6R subtelomere and 300 bp of TG₁₋₃ repeats) and plasmids pCB22, pCB3, pCB23, pCB4 and pCB24 with 6 to 24 Rap1 sites respectively derived from sp1003. To fuse the chromosome 6 right end to the chromosome 1 right end at *IMD1*, cells were transformed with XhoI NotI cut plasmid pCB26 (including the entire 6R subtelomere without TG₁₋₃ repeats) and sp630 (including the entire 6R subtelomere and a telomere-telomere fusion with approximately 450 bp of TG₁₋₃ repeats). Integration is relatively inefficient but remarkably specific, probably due to the simultaneous double selection on galactose plates lacking leucine. The *CEN4-kLEU2* cassette was inserted in the chromosome 6 right arm through a PCR-mediated transformation as previously described (Longtine et al., 1998; López et al., 2015). The inserted Rap1 sites (underlined) are tandem arrays of the GATCCTACACCCATACACCTTACACCCAGACACCA sequence (Grossi et al., 2001). The mutated Rap1 sites are tandem arrays of the GATCCTACTCCCATACTCCTTACTCCCAGACTCCA sequence.

The *smc2-AID* allele was created with plasmid pHyg-AID*-9myc::NAT or pHyg-AID*-9myc::HPH and osTIR1 inserted at

URA3 after digestion of PNHK53 by StuI (Morawska and Ulrich, 2013). The *SPC42-yeGFP* and *MYO1-TTyeGFP* alleles were created with plasmids pYM26 and sp585, respectively, and the *SPC42-mCherry* allele was created with the plasmid pFA6-mCherry-HPHB-MX6. The TTyeGFP-Spo20⁵¹⁻⁹¹ plasma membrane marker (Kuilman et al., 2015) is expressed from a plasmid integrated at the *URA3* locus.

The *GFP-lacI*** and *lacI-mCherry* alleles were integrated at the *URA3* locus (Dubarry et al., 2011). Both proteins are C-terminal truncated lacI ending at Leu³⁵⁰ and lacking the tetramerization sequence. The affinity of the lacI** allele is lowered by the insertion of three glycines replacing Gln⁶⁰ in the hinge region, downstream of the DNA binding domain (Dubarry et al., 2011; Falcon and Matthews, 1999). In addition, the GFP tag in amino-terminal position can further decrease lacI** interaction with lacO. The mCherry tag of the high-affinity lacI is in carboxy-terminal position.

The *lacO* arrays were integrated in chromosome 7 at coordinate 484500 (16.5 kb from *CEN7*) and coordinate 166500 (~330 kb from *CEN7*) with plasmids pAT381 (200 sites (Dubarry et al., 2011)), sp629 (100 sites) and sp628 (50sites) as described in (Rohner et al., 2008). The 16 Rap1 sites - NAT cassette was inserted through a PCR-mediated transformation in chromosome 7 at coordinates 413049 (at position 1/6) or coordinates 206707 (at position 1/2). Gene deletions were obtained through a PCR-mediated transformation as described in (Longtine et al., 1998). To generate a *myo1-Δ* strain, we first generated a diploid by crossing *bud4*-strain Lev752 and *BUD4*⁺ strain 134-1a

(López et al., 2015). One copy of *MYO1* was deleted. Viable *BUD4⁺ myo1-Δ* spores were backcrossed twice in the W303 background and restricted several times to select for normal growth, generating strains YTG84 and YTG87. Video-microscopy with the TTyGFP-Spo20⁵¹⁻⁹¹ plasma membrane marker confirmed the normal timing and efficiency of cytokinesis in these *myo1-Δ* strains.

Cell cycle synchronization and protein degradation

Cells were arrested in G1 with 10⁻⁷ M α -factor (from a 10⁻³ M stock solution in ethanol) and released by two washes in rich medium. Cells were arrested in G2/M with 5 μ g/mL nocodazole (from 1.5 mg/mL stock solution in DMSO) and released by 3 YPD 1 % DMSO washes. IAA (Sigma-Aldrich I2886) was added to a 2mM final concentration (from 500 mM stock solution in ethanol). IPTG was added to a 2mM final concentration (from a 1M stock solution in water) immediately after G1 or G2/M releases. The efficiency of the arrests and releases was checked by microscopy.

PFGE and Southern blot

Yeast DNA embedded in agarose plugs was prepared as follows. About 1-2.10⁸ cells were harvested, washed with 1 mL of 1% Triton, 250 mM EDTA, 10 mM Tris (pH 7.5) and frozen at -80°C. Pellets were resuspended in 120 μ L of 50 mM EDTA, 10 mM Tris (pH 7.5), quickly warmed to 42°C and mixed with 200 μ L of prewarmed 1% agarose LMP. The suspension was distributed into 80 μ L wells placed on a cool surface. The plugs were extruded and incubated overnight at 37°C in 1 mL of 500 mM EDTA, 10 mM

Tris (pH 7.5), 40 μ g/mL of Zymolyase-100T (MP Biomedical 32093). The following day, plugs were incubated 6 h at 53°C in 1 mL of 500 mM EDTA, 10 mM Tris (pH 8.0), 1% N-Laurylsarcosyl, 0.5 mg/mL Proteinase K (Invitrogen P/N 100005393). Plugs were washed for 30 minutes three times in 1 mL of 50 mM EDTA, 10 mM Tris (pH 7.5). Pulse-field electrophoresis was carried out in a 0.9% agarose gel in 0.5X TBE at 14°C with a CHEF DR III from Bio-Rad with a switch time ramping up from 60 to 120 seconds in 24 hours (to resolve the whole karyotype), with a switch time ramping up from 15 to 30 seconds in 24 hours (to resolve fragments from 20 to 400 kb; Figure 5A) or a switch time ramping up from 20 to 40 seconds in 24 hours (to resolve fragments from 50 to 600 kb; Figure 5D). Chromosomes were labelled with gel red and scanned (Supplemental Figures 10 and 11) prior blotting. The template for the Southern blot probe is a gel-purified PCR product of the *TUB2* gene amplified from yeast genomic DNA. Large chromosomes, including 6+7 dicentrics, can be fragmented during plug preparation, generating a smearing signal, a technical issue more frequent with G2/M arrested samples (for instance Figure 3B left panel *myo1-ΔID* cells in G2/M or Figure 5B right panel WT cells in G2/M).

Time-lapse microscopy

The higher resolution live-cell images of **Figure 3A** were acquired using an inverted Spinning Disk microscope (Nikon Eclipse Ti-E and Yokogawa CSU-X1-A1) equipped with a perfect focus system, a 100x APO TIRF/1.49NA immersion objective, a Prime 95B camera

(Photometrics) and a Live-SR module (Roper). The system is piloted by MetaMorph software (Molecular Device). Cells were grown exponentially in synthetic medium and plated on synthetic medium 1% agarose pads before imaging at 30°C. GFP and mCherry images were acquired sequentially with an exposure of 50 msec using 491 nm (Cobolt Calypso, 100 mW) and 561nm (Cobolt Jive, 150 mW) lasers, filters used were [BP 470/40, DM 495 nm, BP 520/35 (Nikon) and BP 560/40, DM 595 nm, BP 630/60 (Nikon) and dichroic triple BP 405/491/561 nm (Semrock)]. Further processing was done using ImageJ software (National Institute of Health).

Live-cell images of **Figure 4** were acquired using a wide-field microscope based on an inverted microscope (Leica DMI-6000B) equipped with adaptive focus control to eliminate Z drift, a 100×/1.4 NA immersion objective with a Prior NanoScanZ Nanopositioning Piezo Z stage system, a CMOS camera (ORCA-Flash4.0, Hamamatsu), and a solid-state light source (SpectraX, Lumencore). The system is piloted by the MetaMorph software (Molecular Device). Cells were grown exponentially in synthetic medium, and 50 µL of the culture was loaded in microfluidic plates (Y04C plates, ONIX platform, CellASIC) equilibrated at 30°C for 2 hours. GFP and mCherry images were acquired sequentially for each Z section with an exposure time of 10 msec using solid-state 475- and 575-nm diodes and appropriate filters (GFP-mCherry filter, excitation: double BP, 450–490/550–590 nm, and dichroic double BP, 500–550/600–665 nm, Chroma Technology Corp.). For four-dimensional movies, 25 focal steps of 0.25 µm were

taken every 2 minutes for 2 hours. Three-dimensional data sets were deconvolved using the AutoQuant blind deconvolution algorithm (Media Cybernetics, Inc.) with the point-spread function appropriate for our microscope at each emission wavelength. Further processing was done using ImageJ software (National Institutes of Health).

Acknowledgments

We thank Angela Taddei for lacI, lacI** and lacO array plasmids and suggestions, Frank Uhlmann and Thomas Kuilman for the G20 plasmid, Helle Ulrich for the AID tool kit, Didier Busso and Eléa Dizet (CIGEX platform) for the Rap1 sites plasmids, Pascale Lesage for the anti-Dps1 antibody, Romain Le Bars (IMAGE-GIF platform) for assistance with higher resolution microscopy, John Marko, Damien D’Amours, Sarah Lambert, François-Xavier Barre, Pablo Radicella, Eric Coïc, Laurent Maloisel, Mathias Toulouze and Maoussi Lhuillier-Akakpo for fruitful discussions. This work was supported by grants from Fondation ARC, EDF and ANR (ANR-14-CE10-0021-01). TG was supported by a PhD fellowship from CEA, ANR and a Fondation ARC young researcher grant.

References

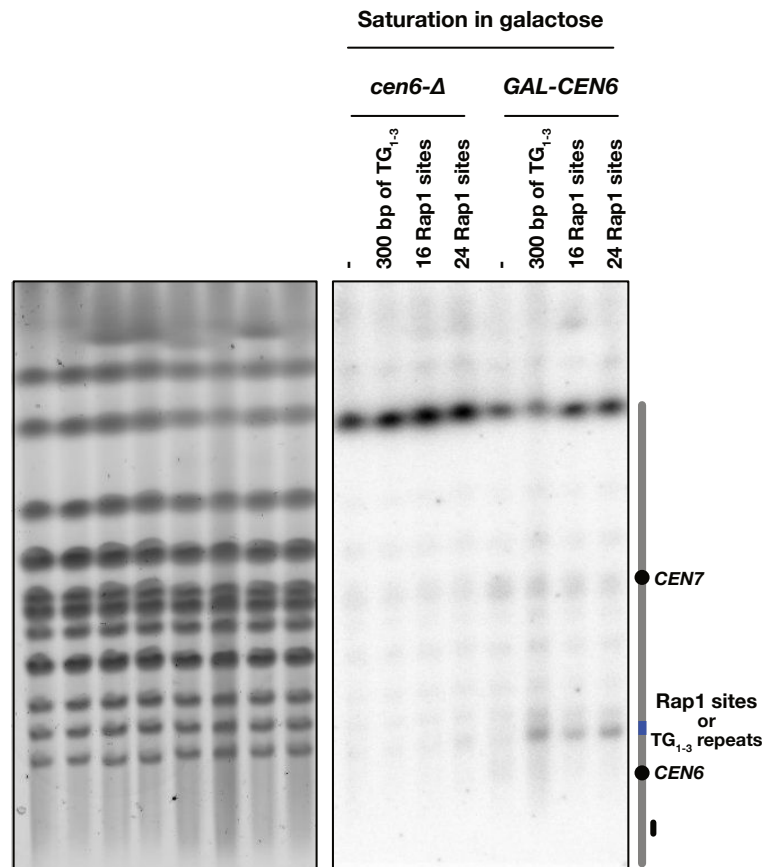
- Amaral, N., Vendrell, A., Funaya, C., Idrissi, F.-Z., Maier, M., Kumar, A., Neurohr, G., Colomina, N., Torres-Rosell, J., Geli, M.-I., et al. (2016). The Aurora-B-dependent NoCut checkpoint prevents damage of anaphase bridges after DNA replication stress. *Nat. Cell Biol.* *18*, 516–526.
- Baxter, J., and Diffley, J.F.X. (2008). Topoisomerase II Inactivation Prevents the Completion of DNA Replication in Budding Yeast. *Molecular Cell* *30*, 790–802.
- Benarroch-Popivker, D., Pisano, S., Mendez-Bermudez, A., Lototska, L., Kaur, P., Bauwens, S.,

- Djerbi, N., Latrick, C.M., Fraasier, V., Pei, B., et al. (2016). TRF2-Mediated Control of Telomere DNA Topology as a Mechanism for Chromosome-End Protection. *Molecular Cell* 61, 274–286.
- Beyer, T., and Weinert, T. (2016). Ontogeny of Unstable Chromosomes Generated by Telomere Error in Budding Yeast. *Plos Genet* 12, e1006345.
- Bétermier, M., Bertrand, P., and Lopez, B.S. (2014). Is Non-Homologous End-Joining Really an Inherently Error-Prone Process? *Plos Genet* 10, e1004086.
- Bi, E., Maddox, P., Lew, D.J., Salmon, E.D., McMillan, J.N., Yeh, E., and Pringle, J.R. (1998). Involvement of an actomyosin contractile ring in *Saccharomyces cerevisiae* cytokinesis. *J. Cell Biol.* 142, 1301–1312.
- Bi, E., and Park, H.-O. (2012). Cell polarization and cytokinesis in budding yeast. *Genetics* 191, 347–387.
- Bloom, K.S. (2007). Beyond the code: the mechanical properties of DNA as they relate to mitosis. *Chromosoma* 117, 103–110.
- Cabib, E., and Arroyo, J. (2013). How carbohydrates sculpt cells: chemical control of morphogenesis in the yeast cell wall. *Nat. Rev. Microbiol.* 11, 648–655.
- Candelli, T., Challal, D., Briand, J.-B., Boulay, J., Porrua, O., Colin, J., and Libri, D. (2018). High-resolution transcription maps reveal the widespread impact of roadblock termination in yeast. *Embo J.* 37, e97490.
- Challal, D., Barucco, M., Kubik, S., Feuerbach, F., Candelli, T., Geoffroy, H., Benaksas, C., Shore, D., and Libri, D. (2018). General Regulatory Factors control the fidelity of transcription by restricting non-coding and ectopic initiation. *bioRxiv* 331793.
- Cheng, T.M.K., Heeger, S., Chaleil, R.A.G., Matthews, N., Stewart, A., Wright, J., Lim, C., Bates, P.A., and Uhlmann, F. (2015). A simple biophysical model emulates budding yeast chromosome condensation. *eLife* 4, e05565.
- Cuylen, S., Metz, J., Hraby, A., and Haering, C.H. (2013). Entrapment of Chromosomes by Condensin Rings Prevents Their Breakage during Cytokinesis. *Developmental Cell* 27, 469–478.
- Diebold-Durand, M.-L., Lee, H., Ruiz Avila, L.B., Noh, H., Shin, H.-C., Im, H., Bock, F.P., Bürmann, F., Durand, A., Basfeld, A., et al. (2017). Structure of Full-Length SMC and Rearrangements Required for Chromosome Organization. *Molecular Cell* 67, 334–347.e335.
- Dubarry, M., Loiodice, I., Chen, C.L., Thermes, C., and Taddei, A. (2011). Tight protein-DNA interactions favor gene silencing. *Genes & Development* 25, 1365–1370.
- Falcon, C.M., and Matthews, K.S. (1999). Glycine insertion in the hinge region of lactose repressor protein alters DNA binding. *J. Biol. Chem.* 274, 30849–30857.
- Ganji, M., Shaltiel, I.A., Bisht, S., Kim, E., Kalichava, A., Haering, C.H., and Dekker, C. (2018). Real-time imaging of DNA loop extrusion by condensin. *Science* 360, 102–105.
- Gibcus, J.H., Samejima, K., Goloborodko, A., Samejima, I., Naumova, N., Nuebler, J., Kanemaki, M.T., Xie, L., Paulson, J.R., Earnshaw, W.C., et al. (2018). A pathway for mitotic chromosome formation. *Science* 359.
- Goto, G.H., Zencir, S., Hirano, Y., Ogi, H., Ivessa, A., and Sugimoto, K. (2015). Binding of Multiple Rap1 Proteins Stimulates Chromosome Breakage Induction during DNA Replication. *Plos Genet* 11, e1005283.
- Grossi, S., Bianchi, A., Damay, P., and Shore, D. (2001). Telomere formation by rap1p binding site arrays reveals end-specific length regulation requirements and active telomeric recombination. *Mol. Cell. Biol.* 21, 8117–8128.
- Hill, A., and Bloom, K. (1989). Acquisition and processing of a conditional dicentric chromosome in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 9, 1368–1370.
- Hirano, T., Funahashi, S., Uemura, T., and Yanagida, M. (1986). Isolation and characterization of *Schizosaccharomyces pombe* cutmutants that block nuclear division but not cytokinesis. *Embo J* 5, 2973–2979.

- Hirano, T. (2017). Capturing condensin in chromosomes. *Nat. Genet.* *49*, 1419–1420.
- Hocquet, C., Robellet, X., Modolo, L., Sun, X.-M., Burny, C., Cuylen-Haering, S., Toselli, E., Clauder-Münster, S., Steinmetz, L., Haering, C.H., et al. (2018). Condensin controls cellular RNA levels through the accurate segregation of chromosomes instead of directly regulating transcription. *bioRxiv* 1–60.
- Hong, Y., Sonnevile, R., Wang, B., Scheidt, V., Meier, B., Woglar, A., Demetriou, S., Labib, K., Jantsch, V., and Gartner, A. (2018). LEM-3 is a midbody-tethered DNA nuclease that resolves chromatin bridges during late mitosis. *Nature Communications* *9*, 728.
- Hou, H., and Cooper, J.P. (2018). Stretching, scrambling, piercing and entangling: Challenges for telomeres in mitotic and meiotic chromosome segregation. *Differentiation* *100*, 12–20.
- Kaddour, A., Colicchio, B., Buron, D., Maalouf, El, E., Laplagne, E., Borie, C., Ricoul, M., Lenain, A., Hempel, W.M., Morat, L., et al. (2017). Transmission of Induced Chromosomal Aberrations through Successive Mitotic Divisions in Human Lymphocytes after In Vitro and In Vivo Radiation. *Sci Rep* *7*, 3291.
- Knight, B., Kubik, S., Ghosh, B., Bruzzone, M.J., Geertz, M., Martin, V., Dénervaud, N., Jacquet, P., Ozkan, B., Rougemont, J., et al. (2014). Two distinct promoter architectures centered on dynamic nucleosomes control ribosomal protein gene transcription. *Genes Dev.* *28*, 1695–1709.
- Kschonsak, M., Merkel, F., Bisht, S., Metz, J., Rybin, V., Hassler, M., and Haering, C.H. (2017). Structural Basis for a Safety-Belt Mechanism That Anchors Condensin to Chromosomes. *Cell* *171*, 588–600.e24.
- Kubik, S., O'Duibhir, E., de Jonge, W.J., Mattarocci, S., Albert, B., Falcone, J.-L., Bruzzone, M.J., Holstege, F.C.P., and Shore, D. (2018). Sequence-Directed Action of RSC Remodeler and General Regulatory Factors Modulates +1 Nucleosome Position to Facilitate Transcription. *Mol. Cell* *71*, 89–102.e5.
- Kuilman, T., Maiolica, A., Godfrey, M., Scheidel, N., Aebersold, R., and Uhlmann, F. (2015). Identification of Cdk targets that control cytokinesis. *Embo J* *34*, 81–96.
- Lavoie, B.D., Hogan, E., and Koshland, D. (2004). In vivo requirements for rDNA chromosome condensation reveal two cell-cycle-regulated pathways for mitotic chromosome folding. *Genes & Development* *18*, 76–87.
- Lazar-Stefanita, L., Scolari, V.F., Mercy, G., Muller, H., Guérin, T.M., Thierry, A., Mozziconacci, J., and Koszul, R. (2017). Cohesins and condensins orchestrate the 4D dynamics of yeast chromosomes during the cell cycle. *Embo J.* *36*, 2684–2697.
- Le Bihan, Y.-V., Matot, B., Pietrement, O., Giraud-Panis, M.-J., Gasparini, S., Le Cam, E., Gilson, E., Sclavi, B., Miron, S., and Le Du, M.-H. (2013). Effect of Rap1 binding on DNA distortion and potassium permanganate hypersensitivity. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* *69*, 409–419.
- Lescasse, R., Pobiega, S., Callebaut, I., and Marcand, S.E.P. (2013). End-joining inhibition at telomeres requires the translocase and polySUMO-dependent ubiquitin ligase Uls1. *Embo J.* *1–11*.
- Lickwar, C.R., Mueller, F., Hanlon, S.E., McNally, J.G., and Lieb, J.D. (2012). Genome-wide protein-DNA binding dynamics suggest a molecular clutch for transcription factor function. *Nature* *484*, 251–255.
- Longtine, M.S., McKenzie, A., Demarini, D.J., Shah, N.G., Wach, A., Brachat, A., Philippsen, P., and Pringle, J.R. (1998). Additional modules for versatile and economical PCR-based gene deletion and modification in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* *14*, 953–961.
- López, V., Barinova, N., Onishi, M., Pobiega, S., Pringle, J.R., Dubrana, K., and Marcand, S. (2015). Cytokinesis breaks dicentric chromosomes preferentially at pericentromeric regions and telomere fusions. *Genes & Development* *29*, 322–336.
- Maciejowski, J., and de Lange, T. (2017). Telomeres in cancer: tumour suppression and

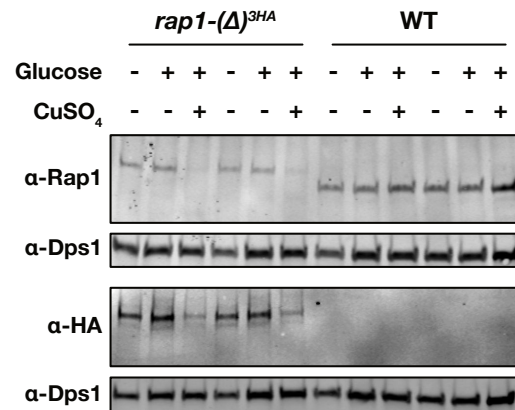
- genome instability. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **18**, 175–186.
- Maciejowski, J., Li, Y., Bosco, N., Campbell, P.J., and de Lange, T. (2015). Chromothripsis and Kataegis Induced by Telomere Crisis. *Cell* **163**, 1641–1654.
- Marko, J.F., De Los Rios, P., Barducci, A., and Gruber, S. (2018). DNA-segment-capture model for loop extrusion by structural maintenance of chromosome (SMC) protein complexes. *bioRxiv* 325373.
- Matot, B., Le Bihan, Y.V., Lescasse, R., Perez, J., Miron, S., David, G., Castaing, B., Weber, P., Raynal, B., Zinn-Justin, S., et al. (2012). The orientation of the C-terminal domain of the *Saccharomyces cerevisiae* Rap1 protein is determined by its binding to DNA. *Nucleic Acids Research* **40**, 3197–3207.
- McClintock, B. (1941). The Stability of Broken Ends of Chromosomes in *Zea Mays*. *Genetics* **26**, 234–282.
- Miller, M.P., Asbury, C.L., and Biggins, S. (2016). A TOG Protein Confers Tension Sensitivity to Kinetochore-Microtubule Attachments. *Cell* **165**, 1428–1439.
- Mohebi, S., Mizuno, K., Watson, A., Carr, A.M., and Murray, J.M. (2015). Checkpoints are blind to replication restart and recombination intermediates that result in gross chromosomal rearrangements. *Nature Communications* **6**, 6357.
- Morawska, M., and Ulrich, H.D. (2013). An expanded tool kit for the auxin-inducible degron system in budding yeast. *Yeast* **30**, 341–351.
- Muller, H.J., and Altenburg, E. (1930). The Frequency of Translocations Produced by X-Rays in *Drosophila*. *Genetics* **15**, 283–311.
- Müller, S., and Almouzni, G. (2017). Chromatin dynamics during the cell cycle at centromeres. *Nature Publishing Group* **18**, 192–208.
- M'kacher, R., Maalouf, E.E.L., Ricoul, M., Heidingsfelder, L., Laplagne, E., Cuceu, C., Hempel, W.M., Colicchio, B., Dieterlen, A., and Sabatier, L. (2014). New tool for biological dosimetry: Reevaluation and automation of the gold standard method following telomere and centromere staining. *Mutat. Res.* **770**, 45–53.
- Nasmyth, K. (2017). How are DNAs woven into chromosomes? *Science* **358**, 589–590.
- Onishi, M., Ko, N., Nishihama, R., and Pringle, J.R. (2013). Distinct roles of Rho1, Cdc42, and Cyk3 in septum formation and abscission during yeast cytokinesis. *J. Cell Biol.* **202**, 311–329.
- Pampalona, J., Roscioli, E., Silkworth, W.T., Bowden, B., Genescà, A., Tusell, L., and Cimini, D. (2016). Chromosome Bridges Maintain Kinetochore-Microtubule Attachment throughout Mitosis and Rarely Break during Anaphase. *PLoS ONE* **11**, e0147420.
- Pobiega, S., and Marcand, S. (2010). Dicentric breakage at telomere fusions. *Genes & Development* **24**, 720–733.
- Proctor, S.A., Minc, N., Boudaoud, A., and Chang, F. (2012). Contributions of Turgor Pressure, the Contractile Ring, and Septum Assembly to Forces in Cytokinesis in Fission Yeast. *Current Biology* **22**, 1601–1608.
- Quevedo, O., García-Luis, J., Matos-Perdomo, E., Aragón, L., and Machín, F. (2012). Nondisjunction of a Single Chromosome Leads to Breakage and Activation of DNA Damage Checkpoint in G2. *Plos Genet* **8**, e1002509.
- Rancati, G., Pavelka, N., Fleharty, B., Noll, A., Trimble, R., Walton, K., Perera, A., Staehling-Hampton, K., Seidel, C.W., and Li, R. (2008). Aneuploidy underlies rapid adaptive evolution of yeast cells deprived of a conserved cytokinesis motor. *Cell* **135**, 879–893.
- Reis, C.C., Batista, S., and Ferreira, M.G. (2012). The fission yeast MRN complex tethers dysfunctional telomeres for NHEJ repair. *Embo J.* **31**, 4576–4586.
- Renshaw, M.J., Ward, J.J., Kanemaki, M., Natsume, K., Nédélec, F.J., and Tanaka, T.U. (2010). Condensins Promote Chromosome Recoiling during Early Anaphase to Complete Sister Chromatid Separation. *Developmental Cell* **19**, 232–244.

- Robellet, X., Thattikota, Y., Wang, F., Wee, T.-L., Pascariu, M., Shankar, S., Bonneil, É., Brown, C.M., and D'Amours, D. (2015). A high-sensitivity phospho-switch triggered by Cdk1 governs chromosome morphogenesis during cell division. *Genes Dev.* 29, 426–439.
- Rohner, S., Gasser, S.M., and Meister, P. (2008). Modules for cloning-free chromatin tagging in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 25, 235–239.
- Shintomi, K., Inoue, F., Watanabe, H., Ohsumi, K., Ohsugi, M., and Hirano, T. (2017). Mitotic chromosome assembly despite nucleosome depletion in *Xenopus* egg extracts. *Science* 356, 1284–1287.
- Sinha, A.K., Durand, A., Desfontaines, J.-M., Iurchenko, I., Auger, H., Leach, D.R.F., Barre, F.-X., and Michel, B. (2017). Division-induced DNA double strand breaks in the chromosome terminus region of *Escherichia coli* lacking RecBCD DNA repair enzyme. *Plos Genet* 13, e1006895.
- Song, W., Gawel, M., Dominska, M., Greenwell, P.W., Hazkani-Covo, E., Bloom, K., and Petes, T.D. (2013). Nonrandom distribution of interhomolog recombination events induced by breakage of a dicentric chromosome in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 194, 69–80.
- Suto, Y. (2016). Review of Cytogenetic analysis of restoration workers for Fukushima Daiichi nuclear power station accident. *Radiat Prot Dosimetry* 171, 61–63.
- Tanaka, K., Mukae, N., Dewar, H., van Breugel, M., James, E.K., Prescott, A.R., Antony, C., and Tanaka, T.U. (2005). Molecular mechanisms of kinetochore capture by spindle microtubules. *Nature* 434, 987–994.
- Thadani, R., Kamenz, J., Heeger, S., Muñoz, S., and Uhlmann, F. (2018). Cell-Cycle Regulation of Dynamic Chromosome Association of the Condensin Complex. *Cell Rep* 23, 2308–2317.
- Thattikota, Y., Tollis, S., Palou, R., Vinet, J., Tyers, M., and D'Amours, D. (2018). Cdc48/VCP Promotes Chromosome Morphogenesis by Releasing Condensin from Self-Entrapment in Chromatin. *Molecular Cell* 69, 664–676.e665.
- Thrower, D.A., and Bloom, K. (2001). Dicentric chromosome stretching during anaphase reveals roles of Sir2/Ku in chromatin compaction in budding yeast. *Molecular Biology of the Cell* 12, 2800–2812.
- van Steensel, B., Smogorzewska, A., and de Lange, T. (1998). TRF2 protects human telomeres from end-to-end fusions. *Cell* 92, 401–413.
- Voth, W.P., Olsen, A.E., Sbia, M., Freedman, K.H., and Stillman, D.J. (2005). ACE2, CBK1, and BUD4 in budding and cell separation. *Eukaryotic Cell* 4, 1018–1028.
- Weiss, E.L. (2012). Mitotic Exit and Separation of Mother and Daughter Cells. *Genetics* 192, 1165–1202.
- Wellinger, R.J., and Zakian, V.A. (2012). Everything you ever wanted to know about *Saccharomyces cerevisiae* telomeres: beginning to end. *Genetics* 191, 1073–1105.
- Williams, T.L., Levy, D.L., Maki-Yonekura, S., Yonekura, K., and Blackburn, E.H. (2010). Characterization of the yeast telomere nucleoprotein core: Rap1 binds independently to each recognition site. *J. Biol. Chem.* 285, 35814–35824.

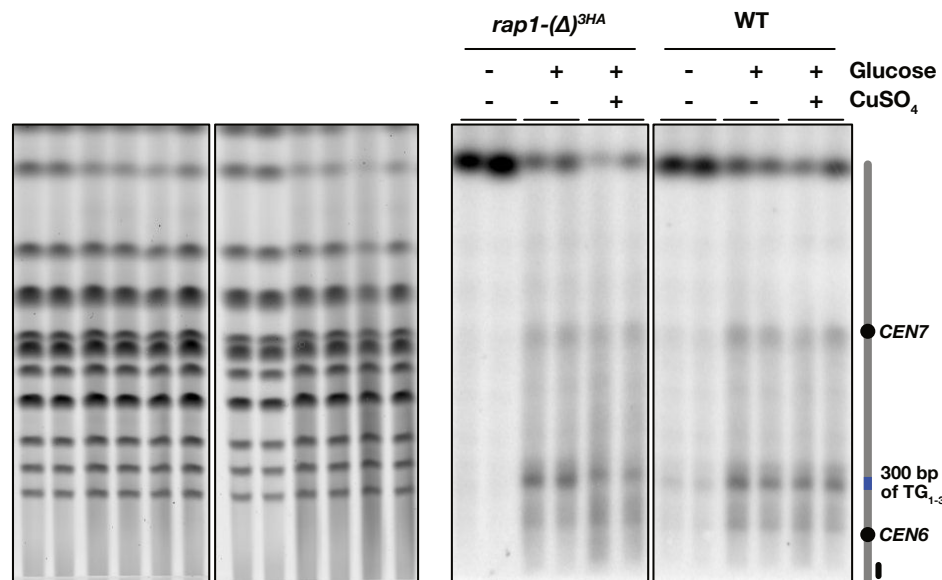


Supplemental Figure S1. Background of breakage at Rap1-bound arrays. Cells possess either a *CEN6*-deleted 6+7 chromosome fusion (*CEN6* is deleted with a loxP/CRE cassette (Pobiega and Marcand, 2010)) or a 6+7 chromosome fusion with a conditional *pGAL1-CEN6-pGAL1* centromere and either no insert or 300bp of telomeric repeats, 16 Rap1 sites or 24 Rap1 sites at the junction between chromosomes 6 and 7. Cells were grown overnight in galactose-containing medium. Chromosomes were separated by PFGE, labeled with Gel Red, and probed with a fragment from the chromosome 6 left arm.

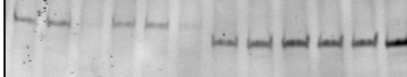
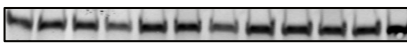
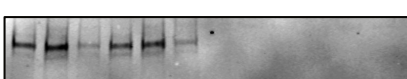
A



B



Supplemental Figure S2. Lower Rap1 level reduces dicentric breakage at internal telomere repeats. Wildtype and *rap1-(Δ)^{3HA}* cells possessing a 6+7 dicentric with 300bp telomeric repeat strains at the junction between chromosomes 6 and 7 were grown asynchronously in galactose-containing medium, switched to glucose-containing medium with or without 200μM CuSO₄ and harvested after one population doubling. **(A)** Rap1 depletion by copper addition. Proteins extracted by urea were analyzed by western blot. Membranes were probed with antibodies against HA or Rap1 and against Dps1 for loading control, scanned and analyzed with an Odyssey imaging system. **(B)** Rap1 depletion reduces breakage at internal telomeric repeats. Chromosomes were separated by PFGE, labelled with Gel Red (bottom panel), blotted and probed with a fragment from chromosome 6 left arm (top panel).

	<i>rap1-(Δ)^{3HA}</i>						WT					
Glucose	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+
CuSO ₄	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+
α-Rap1												
α-Dps1												
α-HA												
α-Dps1												

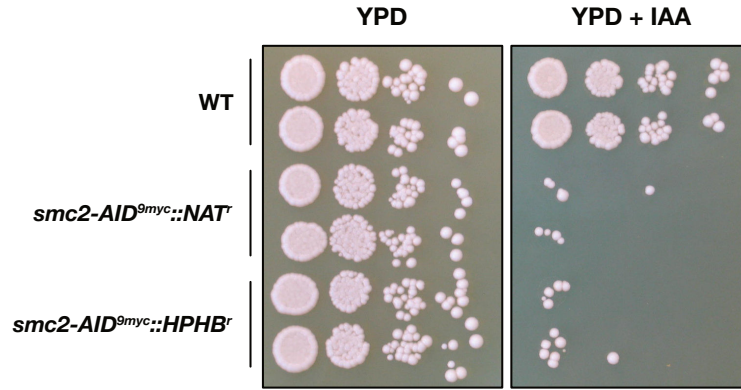
rap1-(Δ)^{3HA} WT

-	+	+	-	+	+
-	-	+	-	-	+
Glucose					
CuSO ₄					

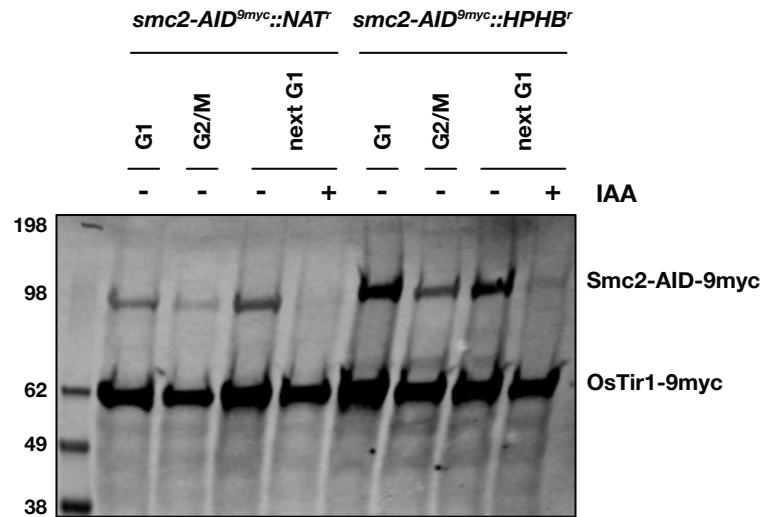
CEN7
300 bp of TG₁₋₃
CEN6

101

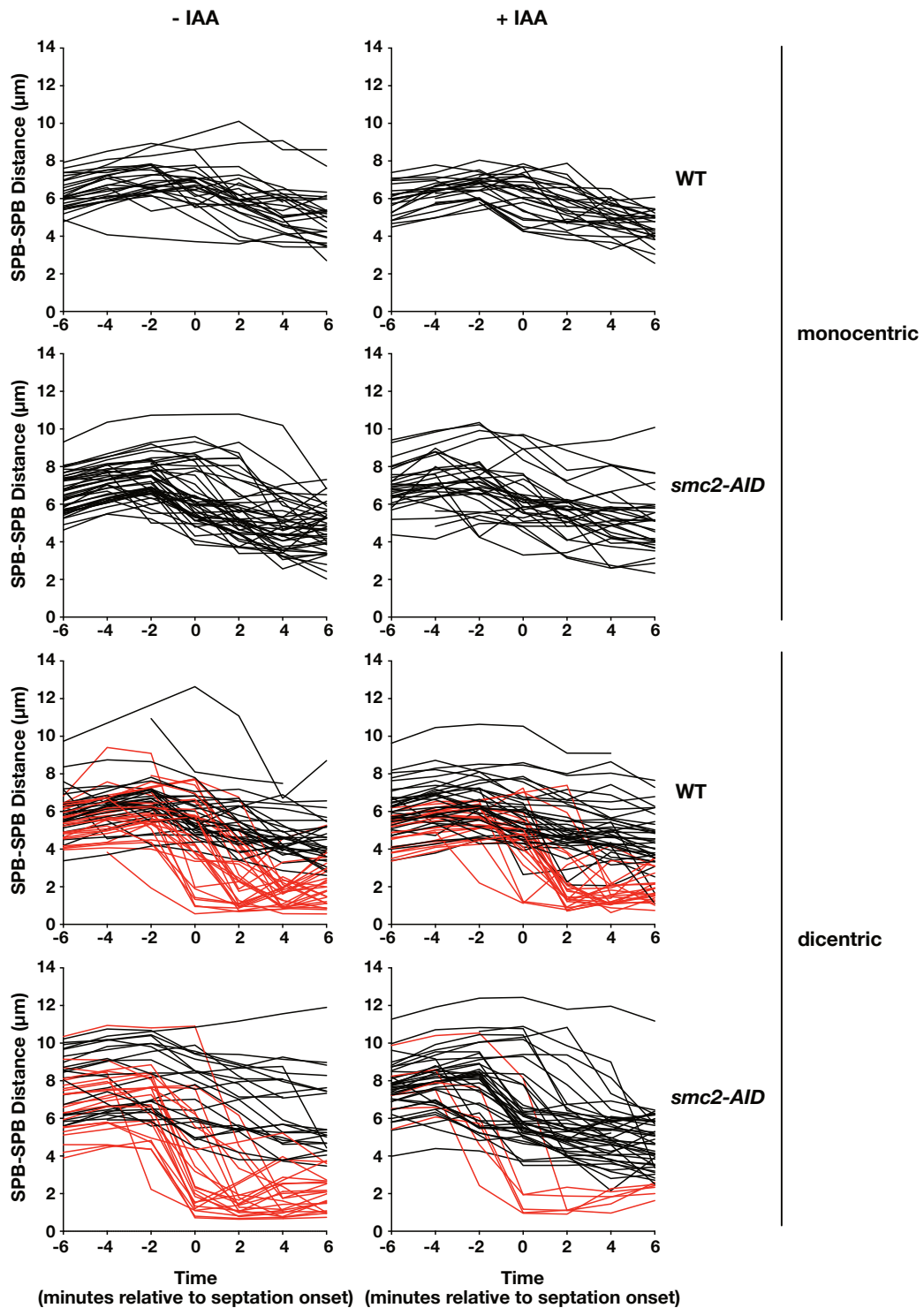
A



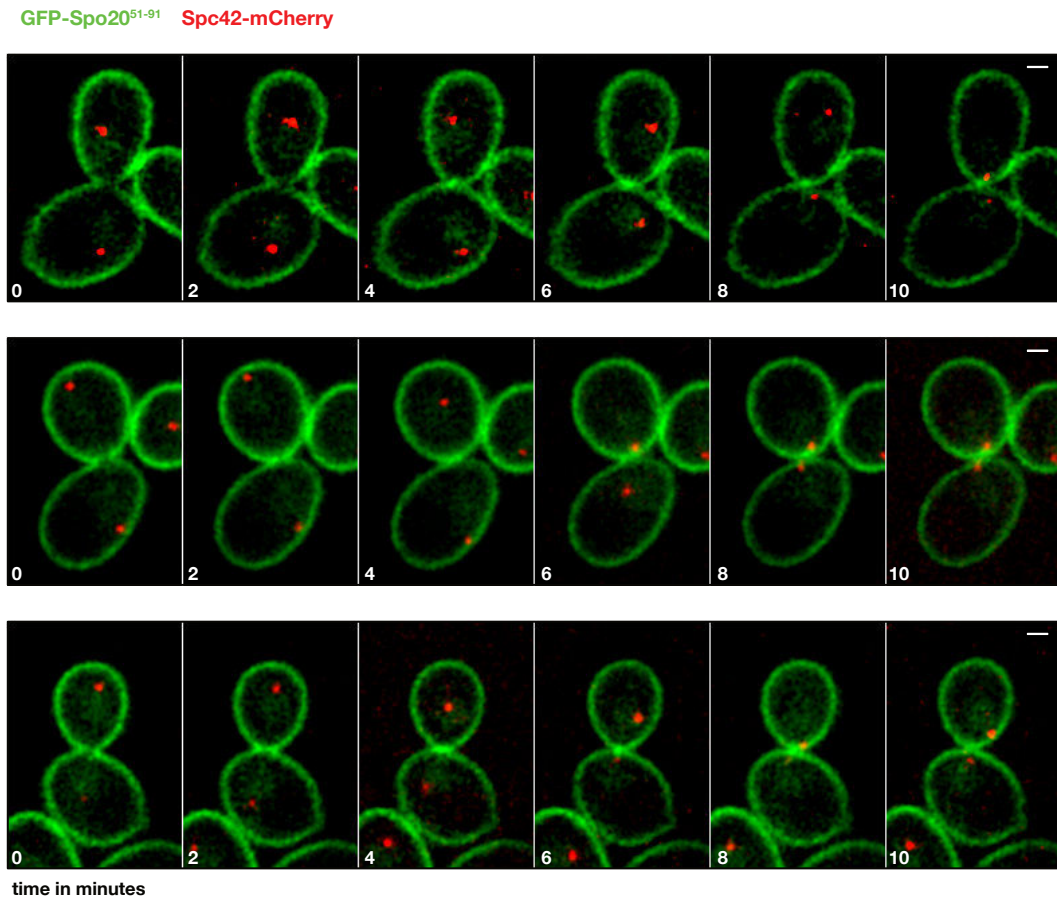
B



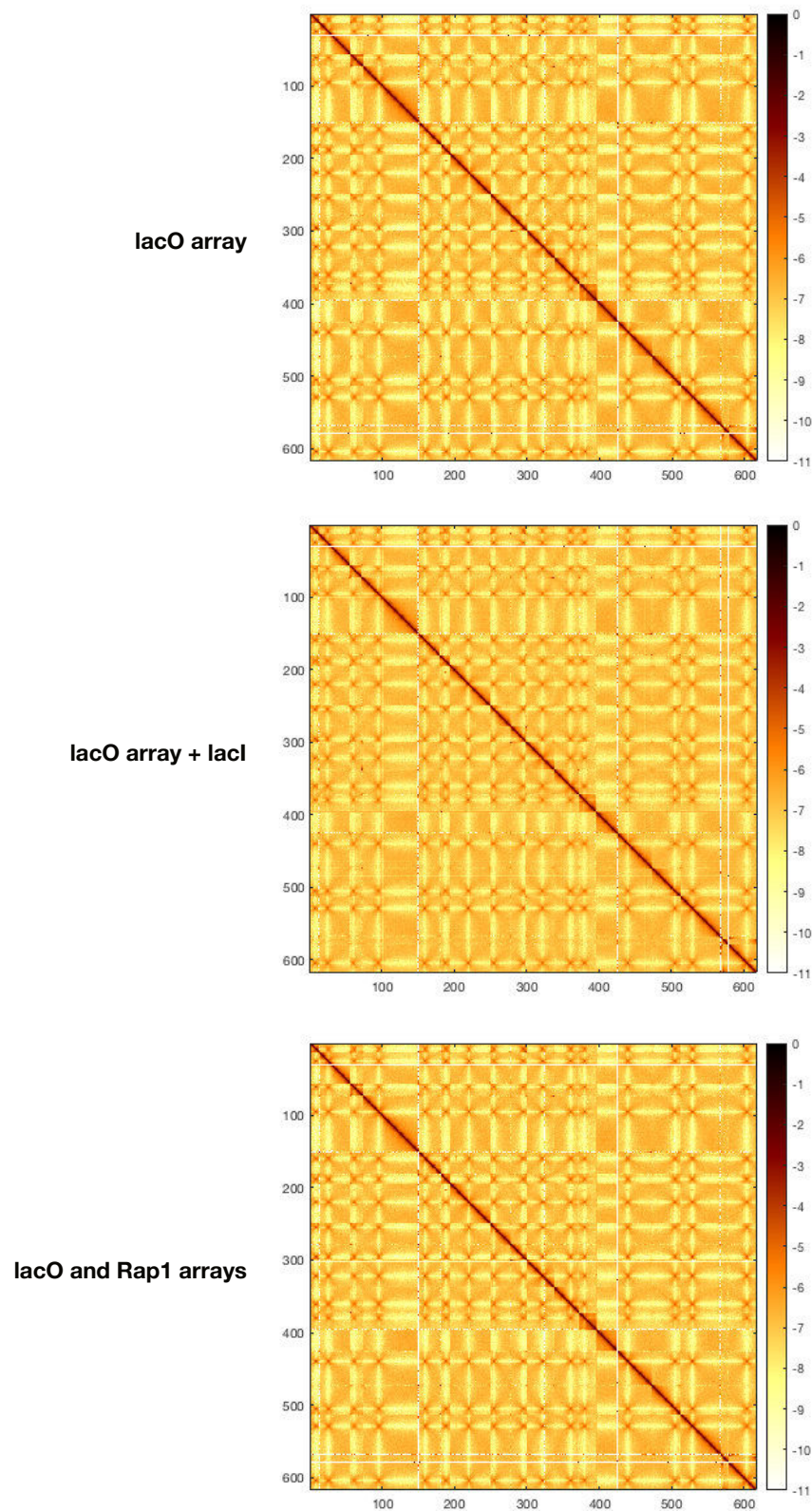
Supplemental Figure S4. Conditional condensin loss through *smc2* auxin-inducible alleles. (A) Loss of viability in response to Smc2 loss. 10-fold serial dilution of wildtype, *smc2-AID^{9myc}::NAT^r* and *smc2-AID^{9myc}::HPHB^r* cells on rich medium with or without 2mM IAA. (B) Loss of Smc2-AID in response to IAA. Cells were grown exponentially in galactose-containing medium, synchronized in G1 with α -factor (G1), released in glucose-containing medium and either blocked in G2/M with nocodazole (G2/M) or allowed to proceed through mitosis with or without IAA (final concentration 2mM) and then blocked in the next G1 with α -factor (next G1). Proteins extracted by urea were analyzed by western blot. Membranes were probed with antibodies against MYC and scanned with an Odyssey imaging system. All cells express a myc-tagged version of OsTir1.



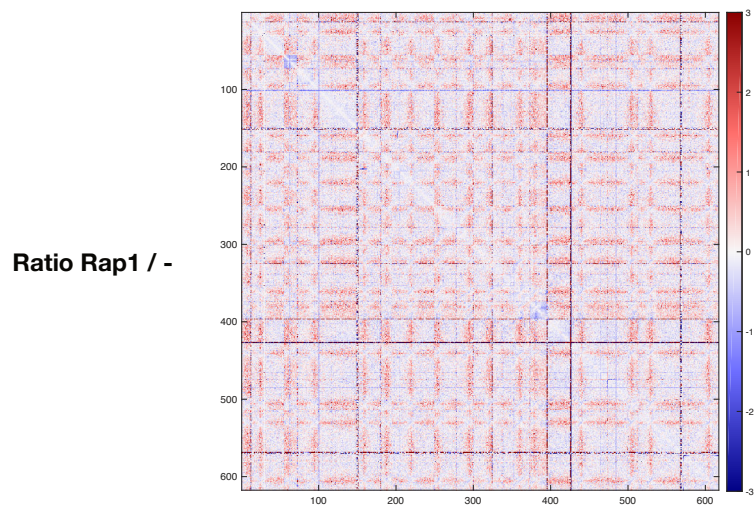
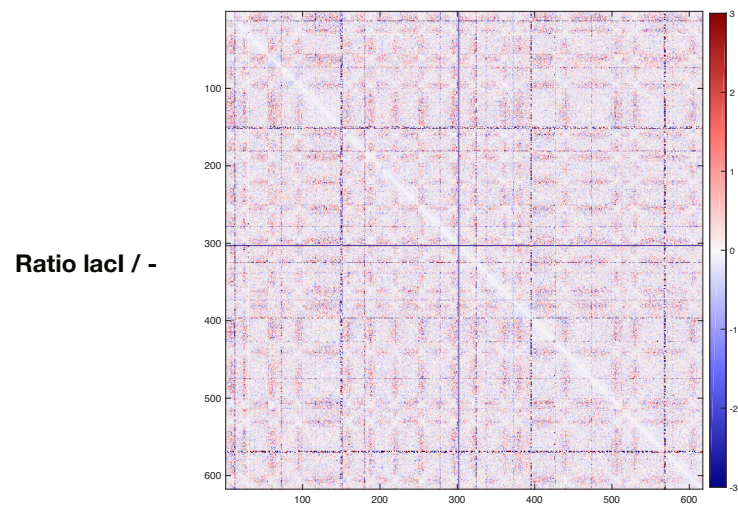
Supplemental Figure S5. Impact of condensin loss on dicentric-induced SPB dynamics. TTyGFP-Spo20⁵¹⁻⁹¹ Spc42-mCherry wild-type and *smc2-AID* cells possessing a dicentric 6+7 were grown in galactose-containing medium and switch to glucose 30 minutes with or without 2mM IAA before imaging at 30°C. Monocentric cells were directly imaged in glucose-containing medium with or without 2mM IAA. Distances in μm between the two SPBs are measured every 2 minutes during late anaphase until 6 minutes after septation onset. Time 0 marks the first image with a closing septum. Cells where SPBs snap back (red lines) are defined as the ones where the distance between the two SPBs is inferior to $2\mu\text{m}$ after ingression onset.



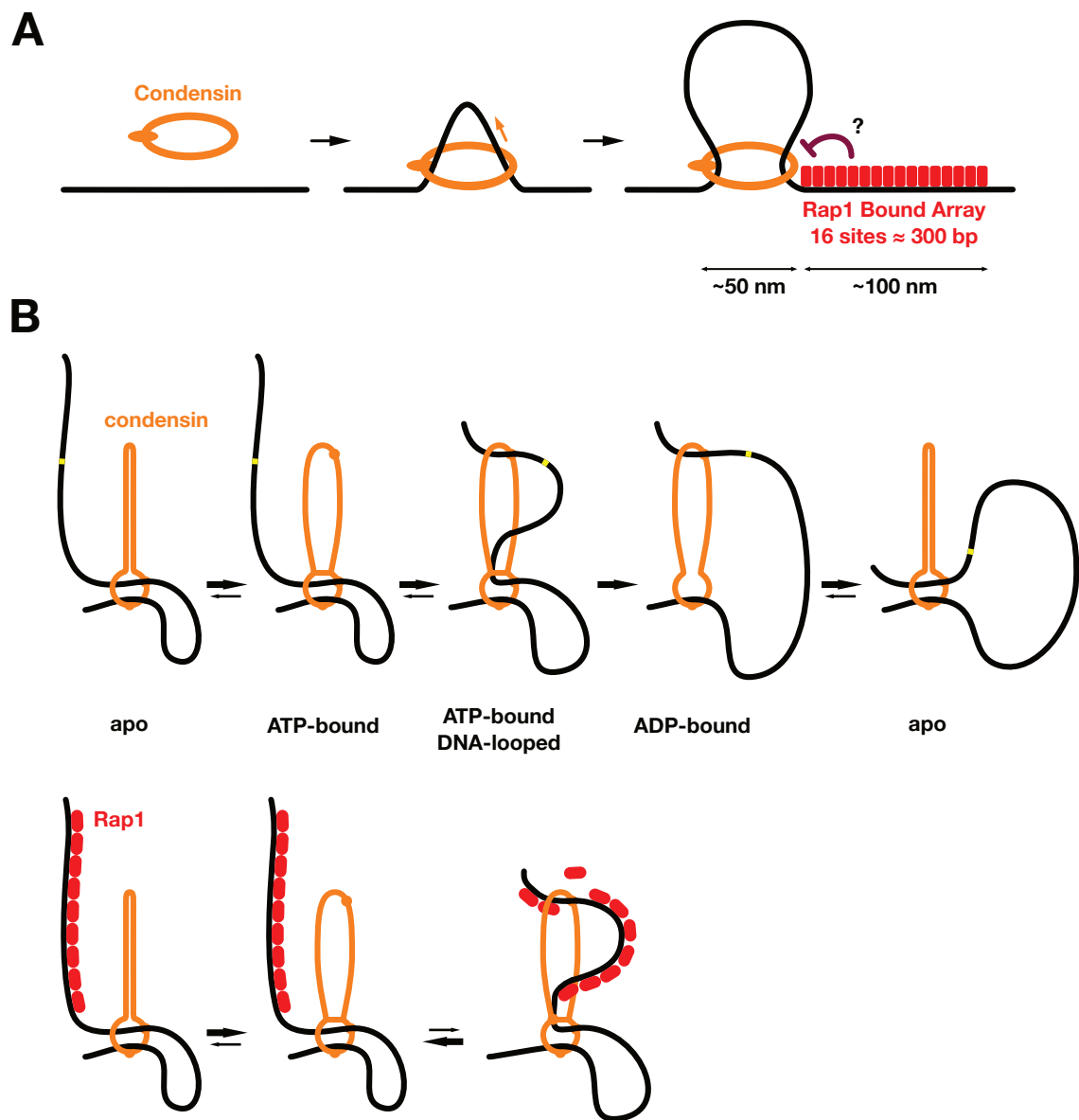
Supplemental Figure S6. Example of an asymmetric dicentric-induced snap back. TTyGFP-Spo20⁵¹⁻⁹¹ Spc42-mCherry wild-type cells possessing a dicentric 6+7 strain were grown exponentially in galactose-containing medium and shifted in glucose 30 minutes prior to image acquisition. One image every 2 minutes.



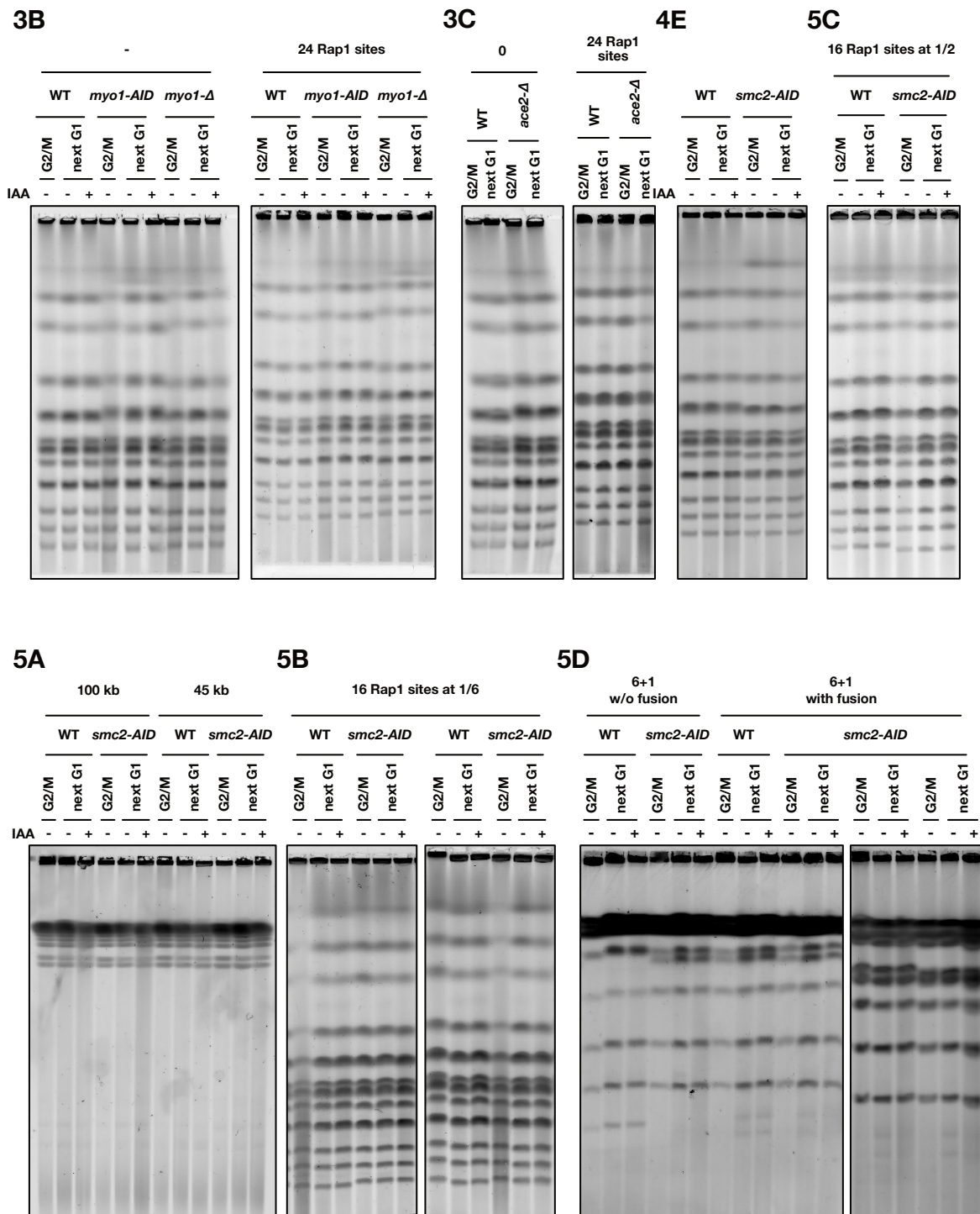
Supplemental Figure S7. Whole-genome contact maps from anaphase arrested cells with lacO and Rap1 arrays. Monocentric *cdc15-2^{ts}* cells with a 200 lacO array inserted at position 166500 in chromosome 7 left arm and either an empty vector (top panel), a vector expressing *lacI* (middle panel) or a tandem array of 16 sites *Rap1* inserted at position 206707 in chromosome 7 left arm (bottom panel) arrested in late anaphase at 36°C. Bin size = 20 kb. The brown to yellow colour scale reflects high to low contact frequencies (log2).



Supplemental Figure S8. Whole-genome log-ratios from anaphase arrested cells with lacO and Rap1 arrays. Log-ratio between pair of maps. The blue to red colour scale reflects the enrichment in contact in one population with respect to the other ($\log_2$). Bin size = 20 kb.



Supplemental Figure S9. A speculative model for condensin stalling by Rap1-bound arrays. **(A)** Rap1-bound arrays longer than condensin may stall loop extrusion when encountering condensin. **(B)** Rap1-bound arrays may antagonize the formation of small intermediate loops during the loop extrusion reaction. Top panel: a model for loop extrusion by condensin from (Diebold-Durand et al., 2017) and (Marko et al., 2018). In the ATP-bound conformation, a small loop generated by Brownian motion passes through the “upper” open compartment formed by the two coiled-coil domain. DNA-condensin interaction at the hinge domain stabilizes this intermediate loop. The two following steps, ATP hydrolysis and ADP release, ensure its translocation. Bottom panel: model for condensin stalling at Rap1-bound arrays. A Rap1-bound array longer than condensin ($>\sim 50$ nm or ≈ 8 Rap1 sites in tandem) may stall the ATP-bound step by outcompeting the predicted DNA interaction with the hinge domain and by stiffening DNA.



Supplemental Figure S11. Chromosomes were separated by PFGE and labelled with Gel Red prior to blotting. These gels correspond to the Southern blots shown in Figures 3, 4 and 5.

Supplemental Table S1. Yeast strains used in this study. Strains are from the W303-1a background (*ade2-1 trp1-1 ura3-1 leu2-3,112 his3-11,15 can1-100 RAD5*) except strain 234-1a from the RM11 background (*leu2-Δ ura3-Δ ho::loxP-KAN^r-loxP*).

Strain	Genotype
Lev831	<i>MATa bar1-Δ KAN^r-pGAL1-CEN6-pGAL1-skHIS3 ADE2</i> (López et al., 2015)
Lev833	<i>MATa bar1-Δ KAN^r-pGAL1-CEN6-pGAL1-skHIS3 ADE2</i> (López et al., 2015)
YCB143	<i>MATa bar1-Δ KAN^r-pGAL1-CEN6-pGAL1-skHIS3 ADE2 6R-klLEU2-7L</i>
YCB147	<i>MATa bar1-Δ KAN^r-pGAL1-CEN6-pGAL1-skHIS3 ADE2 6R-300 bp TG₁₋₃-klLEU2-7L</i>
YCB136	<i>MATa bar1-Δ KAN^r-pGAL1-CEN6-pGAL1-skHIS3 ADE2 6R-(Δsubtelo^a)-6 Rap1 sites-klLEU2-7L</i>
YCB134	<i>MATa bar1-Δ KAN^r-pGAL1-CEN6-pGAL1-skHIS3 ADE2 6R-(Δsubtelo^a)-8 Rap1 sites-klLEU2-7L</i>
YCB138	<i>MATa bar1-Δ KAN^r-pGAL1-CEN6-pGAL1-skHIS3 ADE2 6R-(Δsubtelo^a)-12 Rap1 sites-klLEU2-7L</i>
YCB127	<i>MATa bar1-Δ KAN^r-pGAL1-CEN6-pGAL1-skHIS3 ADE2 6R-(Δsubtelo^a)-16 Rap1 sites-klLEU2-7L</i>
YCB140	<i>MATa bar1-Δ KAN^r-pGAL1-CEN6-pGAL1-skHIS3 ADE2 6R-(Δsubtelo^a)-24 Rap1 sites-klLEU2-7L</i>
YCB141	<i>MATa bar1-Δ KAN^r-pGAL1-CEN6-pGAL1-skHIS3 ADE2 6R-(Δsubtelo^a)-klLEU2-7L</i>
YCB126	<i>MATa bar1-Δ KAN^r-pGAL1-CEN6-pGAL1-skHIS3 ADE2 6R-(Δsubtelo^a)-16 Rap1 sites-klLEU2-7L</i>
YCB131	<i>MATa bar1-Δ KAN^r-pGAL1-CEN6-pGAL1-skHIS3 ADE2 16 Rap1 sites in 7L at position 206707::NAT^r</i>

YCB152	<i>MATa bar1-Δ KAN^r-pGAL1-CEN6-pGAL1-skHIS3 ADE2 16 Rap1 sites in 7L at position 206707::NAT^r 6R-(Δsubtelo^a)-klLEU2-7L</i>
YCB142	<i>MATa bar1-Δ KAN^r-pGAL1-CEN6-pGAL1-skHIS3 ADE2 6R-(Δsubtelo^a)-klLEU2-7L</i>
YCB139	<i>MATa bar1-Δ KAN^r-pGAL1-CEN6-pGAL1-skHIS3 ADE2 6R-(Δsubtelo^a)-24 Rap1 sites-klLEU2-7L</i>
YCB175	<i>MATa bar1-Δ KAN^r-pGAL1-CEN6-pGAL1-skHIS3 ADE2 6R-(Δsubtelo^a)-28 mutated Rap1 sites-klLEU2-7L</i>
YCB176	<i>MATa bar1-Δ KAN^r-pGAL1-CEN6-pGAL1-skHIS3 ADE2 6R-(Δsubtelo^a)-28 mutated Rap1 sites-klLEU2-7L</i>
257-1a pRS406	<i>MATa bar1-Δ KAN^r-pGAL1-CEN6-pGAL1-skHIS3 ADE2 SPC42-mCherry::HPHB^r 200 lacO in 7L at position 166500::TRP1 ura3-1::URA3</i>
257-1a pKD63	<i>MATa bar1-Δ KAN^r-pGAL1-CEN6-pGAL1-skHIS3 ADE2 SPC42-mCherry::HPHB^r 200 lacO in 7L at position 166500::TRP1 ura3-1::lacI-mCherry::URA3</i>
257-1a sp613	<i>MATa bar1-Δ KAN^r-pGAL1-CEN6-pGAL1-skHIS3 ADE2 SPC42-mCherry::HPHB^r 200 lacO in 7L at position 166500::TRP1 ura3-1::lacI**-GFP::URA3</i>
257-1a pRS406 sp625	<i>MATa bar1-Δ KAN^r-pGAL1-CEN6-pGAL1-skHIS3 ADE2 SPC42-mCherry::HPHB^r 200 lacO in 7L at position 166500::TRP1 ura3-1::URA3 6R-klLEU2-7L</i>
257-1a sp613 sp625	<i>MATa bar1-Δ KAN^r-pGAL1-CEN6-pGAL1-skHIS3 ADE2 SPC42-mCherry::HPHB^r 200 lacO in 7L at position 166500::TRP1 ura3-1::lacI**-GFP::URA3 6R-klLEU2-7L</i>
257-1a pKD63 sp625	<i>MATa bar1-Δ KAN^r-pGAL1-CEN6-pGAL1-skHIS3 ADE2 SPC42-mCherry::HPHB^r 200 lacO in 7L at position 166500::TRP1 ura3-1::lacI-mCherry::URA3 6R-klLEU2-7L</i>
YTG304	<i>MATa bar1-Δ KAN^r-pGAL1-CEN6-pGAL1-skHIS3 ADE2 100 lacO in 7L at position 166500::TRP1 ura3-1::lacI-mCherry::URA3</i>

YCB188	<i>MATa bar1-Δ KAN^r-pGAL1-CEN6-pGAL1-skHIS3 ADE2 100 lacO in 7L at position 166500::TRP1 ura3-1::lacI-mCherry::URA3 6R-klLEU2-7L</i>
YTG300	<i>MATa bar1-Δ KAN^r-pGAL1-CEN6-pGAL1-skHIS3 ADE2 50 lacO in 7L at position 166500::TRP1 ura3-1::lacI-mCherry::URA3</i>
YTG307	<i>MATa bar1-Δ KAN^r-pGAL1-CEN6-pGAL1-skHIS3 ADE2 50 lacO in 7L at position 166500::TRP1 ura3-1::lacI-mCherry::URA3 6R-klLEU2-7L</i>
Lev801	<i>MATa bar1-Δ KAN^r-pGAL1-CEN6-pGAL1-skHIS3 6R-(Δsubtelo^a)-klLEU2-7L (López et al., 2015)</i>
YCB186	<i>MATa bar1-Δ KAN^r-pGAL1-CEN6-pGAL1-skHIS3 ura3-1::lacI-mCherry::URA3 6R-(Δsubtelo^a)-klLEU2-7L</i>
YTG33	<i>MATa bar1-Δ KAN^r-pGAL1-CEN6-pGAL1-skHIS3 ADE2 trp1-1::SPO20⁵¹⁻⁹¹-TTYeGFP::TRP1 HTA1-mCherry::HPHB^r</i>
YTG33 sp1003	<i>MATa bar1-Δ KAN^r-pGAL1-CEN6-pGAL1-skHIS3 ADE2 trp1-1::SPO20⁵¹⁻⁹¹-TTYeGFP::TRP1 HTA1-mCherry::HPHB^r 6R-(Δsubtelo^a)-klLEU2-7L</i>
Lvl225	<i>MATa bar1-Δ KAN^r-pGAL1-CEN6-pGAL1-skHIS3 ura3-1::ADH1-osTIR^{9myc}::URA3 myo1-AID^{9myc}::HPHB^r (López et al., 2015)</i>
YCB202	<i>MATa bar1-Δ KAN^r-pGAL1-CEN6-pGAL1-skHIS3 ura3-1::ADH1-osTIR^{9myc}::URA3 myo1-AID^{9myc}::HPHB^r 6R-klLEU2-7L</i>
234-1a	<i>MATa KAN^r-pGAL1-CEN6-pGAL1-skHIS3 BUD4 (López et al., 2015)</i>
YTG88	<i>MATa bar1-Δ KAN^r-pGAL1-CEN6-pGAL1-skHIS3 BUD4 myo1-Δ::NAT^r trp1-1::SPO20⁵¹⁻⁹¹-TTYeGFP::TRP1 HTA1-mCherry::HPHB^r</i>
YCB198	<i>MATa bar1-Δ KAN^r-pGAL1-CEN6-pGAL1-skHIS3 BUD4 myo1-Δ::NAT^r trp1-1::SPO20⁵¹⁻⁹¹-TTYeGFP::TRP1 HTA1-mCherry::HPHB^r 6R-klLEU2-7L</i>
YCB191	<i>MATa bar1-Δ KAN^r-pGAL1-CEN6-pGAL1-skHIS3 ura3-1::ADH1-osTIR^{9myc}::URA3 myo1-AID^{9myc}::HPHB^r 6R- 24 Rap1 sites-klLEU2-7L</i>

YCB193	<i>MATa bar1-Δ KAN^r-pGAL1-CEN6-pGAL1-skHIS3 BUD4 myo1-Δ::NAT trp1-1::SPO2051-91-TTyeGFP::TRP1 HTA1-mCherry::HPHB^r 6R- 24 Rap1 sites-klLEU2-7L</i>
Lev752	<i>MATa bar1-Δ KAN^r-pGAL1-CEN6-pGAL1-skHIS3</i> (López et al., 2015)
YCB207	<i>MATa bar1-Δ KAN^r-pGAL1-CEN6-pGAL1-skHIS3 ace2-Δ::klURA3</i>
YCB199	<i>MATa bar1-Δ KAN^r-pGAL1-CEN6-pGAL1-skHIS3 ace2-Δ::klURA3 6R-(Δsubtelo^a)-klLEU2-7L</i>
YCB195	<i>MATa bar1-Δ KAN^r-pGAL1-CEN6-pGAL1-skHIS3 ace2-Δ::klURA3 6R-(Δsubtelo^a)- 24 Rap1 sites-klLEU2-7L</i>
248-1c	<i>MATa bar1-Δ KAN^r-pGAL1-CEN6-pGAL1-skHIS3 ADE2 trp1-1::SPO20⁵¹⁻⁹¹-TTyeGFP::TRP1 SPC42-mCherry::HPHB^r</i>
248-1c sp1003	<i>MATa bar1-Δ KAN^r-pGAL1-CEN6-pGAL1-skHIS3 ADE2 trp1-1::SPO20⁵¹⁻⁹¹-TTyeGFP::TRP1 SPC42-mCherry::HPHB^r 6R-(Δsubtelo^a)-klLEU2-7L</i>
YTG208	<i>MATa bar1-Δ KAN^r-pGAL1-CEN6-pGAL1-skHIS3 ADE2 trp1-1::SPO20⁵¹⁻⁹¹-TTyeGFP::TRP1 SPC42-mCherry::HPHB^r ura3-1::osTIR1^{9myc}::URA3 smc2-AID^{9myc}::NAT^r</i>
YTG226	<i>MATa bar1-Δ KAN^r-pGAL1-CEN6-pGAL1-skHIS3 ADE2 trp1-1::SPO20⁵¹⁻⁹¹-TTyeGFP::TRP1 SPC42-mCherry::HPHB^r ura3-1::osTIR1^{9myc}::URA3 smc2-AID^{9myc}::NAT^r 6R-(Δsubtelo^a)-klLEU2-7L</i>
Lev 819	<i>MATa bar1-Δ KAN^r-pGAL1-CEN6-pGAL1-skHIS3 ADE2 MYO1-yeGFP::HPHB^r SPC42-yeGFP::TRP1</i>
Lev819 CEN4 at 45kb	<i>MATa bar1-Δ KAN^r-pGAL1-CEN6-pGAL1-skHIS3 ADE2 MYO1-yeGFP::HPHB^r SPC42-yeGFP::TRP1 CEN4 in 6R at position 193800::klLEU2</i>
YTG208 CEN4 at 45kb	<i>MATa bar1-Δ KAN^r-pGAL1-CEN6-pGAL1-skHIS3 ADE2 trp1-1::SPO20⁵¹⁻⁹¹-TTyeGFP::TRP1 SPC42-mCherry::HPHB^r smc2-AID^{9myc}::NAT^r ura3-1::osTIR1^{9myc}::URA3 CEN4 in 6R at position 193800::klLEU2</i>

Lev819 CEN4 at 100kb	<i>MATa bar1-Δ KAN^r-pGAL1-CEN6-pGAL1-skHIS3 ADE2 MYO1-yeGFP::HPHB^r SPC42-yeGFP::klTRP1 CEN4 in 6R at position 245700::klLEU2</i>
YTG208 CEN4 at 100kb	<i>MATa bar1-Δ KAN^r-pGAL1-CEN6-pGAL1-skHIS3 ADE2 trp1-1::SPO20⁵¹⁻⁹¹-TTYeGFP::TRP1 SPC42-mCherry::HPHB^r smc2-AID^{9myc}::NAT^r ura3-1::osTIR1^{9myc}::URA3 CEN4 in 6R at position 245700::klLEU2</i>
G1SMC2	<i>MATα bar1-Δ KAN^r-pGAL1-CEN6-pGAL1-skHIS3 ADE2 ura3-1::lacI**-yeGFP-osTIR1^{9myc}::URA3 MYO1-TTYeGFP::TRP1 SPC42-mCherry::HPHB^r</i>
G1SMC2 sp1003	<i>MATα bar1-Δ KAN^r-pGAL1-CEN6-pGAL1-skHIS3 ADE2 ura3-1::lacI**-yeGFP-osTIR1^{9myc}::URA3 MYO1-TTYeGFP::TRP1 SPC42-mCherry::HPHB^r 6R-(Δsubtelo^a)-klLEU2-7L</i>
YTG272	<i>MATα bar1-Δ KAN^r-pGAL1-CEN6-pGAL1-skHIS3 ADE2 ura3-1::lacI**-yeGFP-osTIR1^{9myc}::URA3 MYO1-TTYeGFP::TRP1 SPC42-mCherry::HPHB^r smc2-AID^{9myc}::NAT^r</i>
YTG272 sp1003	<i>MATα bar1-Δ KAN^r-pGAL1-CEN6-pGAL1-skHIS3 ADE2 ura3-1::lacI**-yeGFP-osTIR1^{9myc}::URA3 MYO1-TTYeGFP::TRP1 SPC42-mCherry::HPHB^r smc2-AID^{9myc}::NAT^r 6R-(Δsubtelo^a)-klLEU2-7L</i>
YTG251	<i>MATa bar1-Δ KAN^r-pGAL1-CEN6-pGAL1-skHIS3 ADE2 ura3-1::osTIR1^{9myc}::URA3 8 Rap1 sites in 7L at position 484500::NAT^r</i>
YTG252	<i>MATa bar1-Δ KAN^r-pGAL1-CEN6-pGAL1-skHIS3 ADE2 ura3-1::osTIR1^{9myc}::URA3 8 Rap1 sites in 7L at position 484500::NAT^r smc2-AID^{9myc}::HPHB^r</i>
YTG256	<i>MATa bar1-Δ KAN^r-pGAL1-CEN6-pGAL1-skHIS3 ADE2 ura3-1::osTIR1^{9myc}::URA3 smc2-AID^{9myc}::HPHB^r</i>
YTG255	<i>MATa bar1-Δ KAN^r-pGAL1-CEN6-pGAL1-skHIS3 ADE2 ura3-1::osTIR1^{9myc}::URA3 8 Rap1 sites in 7L at position 206707::NAT^r</i>

YTG258	<i>MATa bar1-Δ KAN^r-pGAL1-CEN6-pGAL1-skHIS3 ADE2 ura3- I::osTIR1^{9myc}::URA3 8 Rap1 sites in 7L at position 206707::NAT^r smc2- AID^{9myc}::HPHB^r</i>
YTG251 sp1003 n°1	<i>MATa bar1-Δ KAN^r-pGAL1-CEN6-pGAL1-skHIS3 ADE2 ura3- I::osTIR1^{9myc}::URA3 smc2-AID^{9myc}::HPHB^r 6R-(Δsubtelo^a)-klLEU2-7L</i>
YTG251 sp1003 n°2	<i>MATa bar1-Δ KAN^r-pGAL1-CEN6-pGAL1-skHIS3 ADE2 ura3- I::osTIR1^{9myc}::URA3 smc2-AID^{9myc}::HPHB^r 6R-(Δsubtelo^a)-klLEU2-7L</i>
YTG256 sp1003 n°1	<i>MATa bar1-Δ KAN^r-pGAL1-CEN6-pGAL1-skHIS3 ADE2 ura3- I::osTIR1^{9myc}::URA3 8 Rap1 sites in 7L at position 484500::NAT^r 6R- (Δsubtelo^a)-klLEU2-7L</i>
YTG256 sp1003 n°2	<i>MATa bar1-Δ KAN^r-pGAL1-CEN6-pGAL1-skHIS3 ADE2 ura3- I::osTIR1^{9myc}::URA3 8 Rap1 sites in 7L at position 484500::NAT^r 6R- (Δsubtelo^a)-klLEU2-7L</i>
YTG252 sp1003 n°1	<i>MATa bar1-Δ KAN^r-pGAL1-CEN6-pGAL1-skHIS3 ADE2 ura3- I::osTIR1^{9myc}::URA3 8 Rap1 sites in 7L at position 484500::NAT^r smc2- AID^{9myc}::HPHB^r 6R-(Δsubtelo^a)-klLEU2-7L</i>
YTG252 sp1003 n°2	<i>MATa bar1-Δ KAN^r-pGAL1-CEN6-pGAL1-skHIS3 ADE2 ura3- I::osTIR1^{9myc}::URA3 8 Rap1 sites in 7L at position 484500::NAT^r smc2- AID^{9myc}::HPHB^r 6R-(Δsubtelo^a)-klLEU2-7L</i>
YTG255 sp1003 n°1	<i>MATa bar1-Δ KAN^r-pGAL1-CEN6-pGAL1-skHIS3 ADE2 ura3- I::osTIR1^{9myc}::URA3 8 Rap1 sites in 7L at position 206707::NAT^r 6R- (Δsubtelo^a)-klLEU2-7L</i>
YTG255 sp1003 n°2	<i>MATa bar1-Δ KAN^r-pGAL1-CEN6-pGAL1-skHIS3 ADE2 ura3- I::osTIR1^{9myc}::URA3 8 Rap1 sites in 7L at position 206707::NAT^r 6R- (Δsubtelo^a)-klLEU2-7L</i>
YTG258 sp1003 n°1	<i>MATa bar1-ΔKAN^r-pGAL1-CEN6-pGAL1-skHIS3 ADE2 ura3- I::osTIR1^{9myc}::URA3 8 Rap1 sites in 7L at position 206707::NAT^r smc2- AID^{9myc}::HPHB^r 6R-(Δsubtelo^a)-klLEU2-7L</i>

YTG258 sp1003 n°2	<i>MATa bar1-ΔKAN^r-pGAL1-CEN6-pGAL1-skHIS3 ADE2 ura3-1::osTIR1^{9myc}::URA3 8 Rap1 sites in 7L at position 206707::NAT^r smc2-AID^{9myc}::HPHB^r 6R-(Δsubtelo^a)-klLEU2-7L</i>
YTG337	<i>MATa bar1-Δ KAN^r-pGAL1-CEN6-pGAL1-skHIS3 ADE2 trp1-1::SPO20⁵¹⁻⁹¹-TTypeGFP::TRP1 SPC42-mCherry::HPHB^r 6R-klLEU2-1R</i>
YTG345	<i>MATa bar1-Δ KAN^r-pGAL1-CEN6-pGAL1-skHIS3 ADE2 trp1-1::SPO20⁵¹⁻⁹¹-TTypeGFP::TRP1 SPC42-mCherry::HPHB^r 6R-Telomere Fusion-klLEU2-1R</i>
YTG347	<i>MATa bar1-Δ KAN^r-pGAL1-CEN6-pGAL1-skHIS3 ADE2 ura3-1::osTIR1^{9myc}::URA3 smc2-AID^{9myc}::HPHB^r 6R-klLEU2-1R</i>
YTG351	<i>MATa bar1-Δ KAN^r-pGAL1-CEN6-pGAL1-skHIS3 ADE2 ura3-1::osTIR1^{9myc}::URA3 smc2-AID^{9myc}::HPHB^r 6R-Telomere Fusion-klLEU2-1R</i>
YTG350	<i>MATa bar1-Δ KAN^r-pGAL1-CEN6-pGAL1-skHIS3 ADE2 ura3-1::osTIR1^{9myc}::URA3 smc2-AID^{9myc}::HPHB^r 6R-Telomere Fusion-klLEU2-1R</i>
YTG352	<i>MATa bar1-Δ KAN^r-pGAL1-CEN6-pGAL1-skHIS3 ADE2 trp1-1::SPO20⁵¹⁻⁹¹-TTypeGFP::TRP1 SPC42-mCherry::HPHB^r ura3-1::osTIR1^{9myc}::URA3 smc2-AID^{9myc}::NAT^r 6R-Telomere Fusion-klLEU2-1R</i>
262-3d	<i>MATa bar1-Δ KAN^r-pGAL1-CEN6-pGAL1-skHIS3 cdc15-2^{ts} 200 lacO in 7L at position 166500::TRP1</i>
262-3d 16Rap1	<i>MATa bar1-Δ KAN^r-pGAL1-CEN6-pGAL1-skHIS3 cdc15-2^{ts} 200 lacO in 7L at position 166500::TRP1 NAT^r::16 sites Rap1 in 7L at position 206707</i>
262-15c pRS406#1	<i>MATa bar1-Δ KAN^r-pGAL1-CEN6-pGAL1-skHIS3 cdc15-2^{ts} 200 lacO in 7L at position 166500::TRP1 ura3-1::URA3</i>
262-15c pKD63#1	<i>MATa bar1-Δ KAN^r-pGAL1-CEN6-pGAL1-skHIS3 cdc15-2^{ts} 200 lacO in 7L at position 166500::TRP1 ura3-1::lacI-mCherry::URA3</i>
SC18-13a sp625#1	<i>MATa bar1-Δ CEN6Δ-loxP-skHIS3 6R-klLEU2-7L</i>

SC18-13a sp626#1	<i>MATa bar1-Δ CEN6Δ-loxP-skHIS3 6R-300 bp TG₁₋₃-klLEU2-7L</i>
YCB123	<i>MATa bar1-Δ loxP-CEN6Δ-loxP -skHIS3 6R-(Δsubtelo^a)-16 Rap1 sites-klLEU2-7L</i>
YCB118	<i>MATa bar1-Δ loxP-loxP-CEN6Δ-skHIS3 6R-(Δsubtelo^a)-24 Rap1 sites-klLEU2-7L</i>
Lev730	<i>MATa bar1-Δ pACE1-UBR1 pACE1-ROX1 KAN^r-pGAL1-CEN6-pGAL1-skHIS3 rap1-(Δ)^{3HA}::KAN^r lif1-Δ::klURA3 (Pobiega and Marcand, 2010)</i>
YCB21	<i>MATa bar1-Δ pACE1-UBR1 pACE1-ROX1 KAN^r-pGAL1-CEN6-pGAL1-skHIS3 rap1-(Δ)^{3HA}::KAN^r lif1-Δ::klURA3 6R-300 bp TG₁₋₃-klLEU2-7L</i>
YCB86	<i>MATa bar1-Δ pACE1-UBR1 pACE1-ROX1 KAN^r-pGAL1-CEN6-pGAL1-skHIS3 rap1-(Δ)^{3HA}::KAN^r lif1-Δ::klURA3 6R-300 bp TG₁₋₃-klLEU2-7L</i>
Lev1212	<i>MATa bar1-Δ pACE1-UBR1 pACE1-ROX1 KAN^r-pGAL1-CEN6-pGAL1-skHIS3 (Pobiega and Marcand, 2010)</i>
YCB114	<i>MATa bar1-Δ pACE1-UBR1 pACE1-ROX1 KAN^r-pGAL1-CEN6-pGAL1-skHIS3 6R- 300 bp TG₁₋₃-klLEU2-7L</i>
YCB115	<i>MATa bar1-Δ pACE1-UBR1 pACE1-ROX1 KAN^r-pGAL1-CEN6-pGAL1-skHIS3 6R- 300 bp TG₁₋₃-klLEU2-7L</i>
YCB78	<i>MATa bar1-Δ KAN^r-pGAL1-CEN6-pGAL1-skHIS3 ADE2 rif1-Δ::NAT^r</i>
YCB96	<i>MATa bar1-Δ KAN^r-pGAL1-CEN6-pGAL1-skHIS3 ADE2 rif1-Δ::NAT^r 6R-300 bp TG₁₋₃-klLEU2-7L</i>
YCB79	<i>MATa bar1-Δ KAN^r-pGAL1-CEN6-pGAL1-skHIS3 ADE2 rif2-Δ::HPHB^r</i>
YCB98	<i>MATa bar1-Δ KAN^r-pGAL1-CEN6-pGAL1-skHIS3 ADE2 rif2-Δ::HPHB^r 6R-300 bp TG₁₋₃-klLEU2-7L</i>
YCB80	<i>MATa bar1-Δ KAN^r-pGAL1-CEN6-pGAL1-skHIS3 ADE2 rif1-Δ::NAT^r rif2-Δ::HPH</i>
YCB100	<i>MATa bar1-Δ KAN^r-pGAL1-CEN6-pGAL1-skHIS3 ADE2 rif1-Δ::NAT^r rif2-Δ::HPHB^r 6R-300 bp TG₁₋₃-klLEU2-7L</i>

YCB83	<i>MATa bar1-Δ KAN^r-pGAL1-CEN6-pGAL1-skHIS3 ADE2 sir2-Δ::HPHB^r hml-Δ::NAT^r</i>
YCB103	<i>MATa bar1-Δ KAN^r-pGAL1-CEN6-pGAL1-skHIS3 ADE2 sir2-Δ::HPHB^r hml-Δ::NAT^r 6R-300 bp TG₁₋₃-klLEU2-7L</i>
YCB155	<i>MATa bar1-Δ KAN^r-pGAL1-CEN6-pGAL1-skHIS3 ADE2 sir3-Δ::HPHB^r hml-Δ::NAT^r</i>
YCB161	<i>MATa bar1-Δ KAN^r-pGAL1-CEN6-pGAL1-skHIS3 ADE2 sir3-Δ::HPHB^r hml-Δ::NAT^r 6R-300 bp TG₁₋₃-klLEU2-7L</i>
YCB124	<i>MATa bar1-Δ KAN^r-pGAL1-CEN6-pGAL1-skHIS3 ADE2 sir4-Δ::HPHB^r hml-Δ::NAT^r</i>
YCB128	<i>MATa bar1-Δ KAN^r-pGAL1-CEN6-pGAL1-skHIS3 ADE2 sir4-Δ::HPHB^r hml-Δ::NAT^r 6R-300 bp TG₁₋₃-klLEU2-7L</i>
YCB106	<i>MATa bar1-Δ KAN^r-pGAL1-CEN6-pGAL1-skHIS3 ADE2 sir3-Δ::klURA3 sir4-Δ::HPHB^r hml-Δ::NAT^r</i>
YCB159	<i>MATa bar1-Δ KAN^r-pGAL1-CEN6-pGAL1-skHIS3 ADE2 sir3-Δ::klURA3 sir4-Δ::HPH hml-Δ::NAT 6R- 300 bp TG₁₋₃-klLEU2-7L</i>
YCB148	<i>MATa bar1-Δ KAN^r-pGAL1-CEN6-pGAL1-skHIS3 ADE2 6R-300 bp TG₁₋₃-klLEU2-7L</i>
YCB97	<i>MATa bar1-Δ KAN^r-pGAL1-CEN6-pGAL1-skHIS3 ADE2 rif1-Δ::NAT^r 6R-300 bp TG₁₋₃-klLEU2-7L</i>
YCB99	<i>MATa bar1-Δ KAN^r-pGAL1-CEN6-pGAL1-skHIS3 ADE2 rif2-Δ::HPHB^r 6R-300 bp TG₁₋₃-klLEU2-7L</i>
YCB101	<i>MATa bar1-Δ KAN^r-pGAL1-CEN6-pGAL1-skHIS3 ADE2 rif1-Δ::NAT^r rif2-Δ::HPHB^r 6R-300 bp TG₁₋₃-klLEU2-7L</i>
YCB104	<i>MATa bar1-Δ KAN^r-pGAL1-CEN6-pGAL1-skHIS3 ADE2 sir2-Δ::HPHB^r hml-Δ::NAT^r 6R-300 bp TG₁₋₃-klLEU2-7L</i>
YCB162	<i>MATa bar1-Δ KAN^r-pGAL1-CEN6-pGAL1-skHIS3 ADE2 sir3-Δ::HPHB^r hml-Δ::NAT^r 6R-300 bp TG₁₋₃-klLEU2-7L</i>

YCB149	<i>MATa bar1-Δ KAN^r-pGAL1-CEN6-pGAL1-skHIS3 ADE2 sir4-Δ::HPHB^r hml-Δ::NAT^r 6R-300 bp TG₁₋₃-klLEU2-7L</i>
YCB160	<i>MATa bar1-Δ KAN^r-pGAL1-CEN6-pGAL1-skHIS3 ADE2 sir3-Δ::klURA3 sir4-Δ::HPHB^r hml-Δ::NAT^r 6R-300 bp TG₁₋₃-klLEU2-7L</i>

^a In *6R (Δsubtelo)* dicentrics, the last 1968 bp of chromosome 6 are deleted (coordinates 268139-270106), see methods.

Résultats complémentaires

***NoCut* ne retarde pas l'abscission en présence de ponts formés par des dicentriques**

Chez la levure, la cytotiérèse casse les chromosomes dicentriques (Lopez et al., 2015). J'ai cherché à visualiser cette cassure en microscopie pour définir le moment où elle a lieu. Par ailleurs, le point de contrôle "*NoCut*" est supposé détecter la présence de chromatine au site de constriction pour retarder l'abscission (Mendoza et al., 2009; Norden et al., 2006). J'ai donc voulu déterminer si l'on pouvait observer un retard d'abscission en présence d'un chromosome dicentrique.

La croissance des septa pendant la cytotiérèse peut être observée en visualisant l'ingression de la membrane plasmique (Weiss, 2012). La diffraction lumineuse empêche cependant d'observer les derniers instants de la fermeture du point de communication entre la cellule mère et la cellule fille, par microscopie à fluorescence. Nous ne pouvons donc qu'inférer une durée maximale du processus d'abscission, par la mesure du temps entre, la fermeture apparente des septa et la première observation de la séparation des membranes plasmiques des cellules mère et fille.

La dynamique des noyaux nous renseigne sur la formation de ponts d'anaphase dans chaque cellule. Elle nous permet donc de comparer la durée de l'abscission en présence et en l'absence de ponts formés par des dicentriques parmi la population d'une même souche possédant un chromosome dicentrique (c.-à-d. en glucose où *CEN6* est de nouveau actif) (**Figure 17A**). Des souches ne contenant que des chromosomes monocentriques sont utilisées en témoin.

Dans une première expérience réalisée à 25°C, le temps moyen entre l'ingression et la séparation des membranes est de 14,4 ($\pm 4,7$) minutes dans un contexte monocentrique. En présence d'un dicentrique, ce temps est de 16,4 (± 5) minutes dans les cellules sans pont et de 20 $\pm$ (6,8) minutes dans celles présentant des ponts dicentriques. La répartition des temps observés cellule par cellule est montrée (**Figure 17B**). Les distributions semblent très proches, confirmant que la présence de ponts d'anaphase induits par un dicentrique ne promeut donc pas l'activation du checkpoint *NoCut* et un retard d'abscission significatif (Amaral et al., 2016).

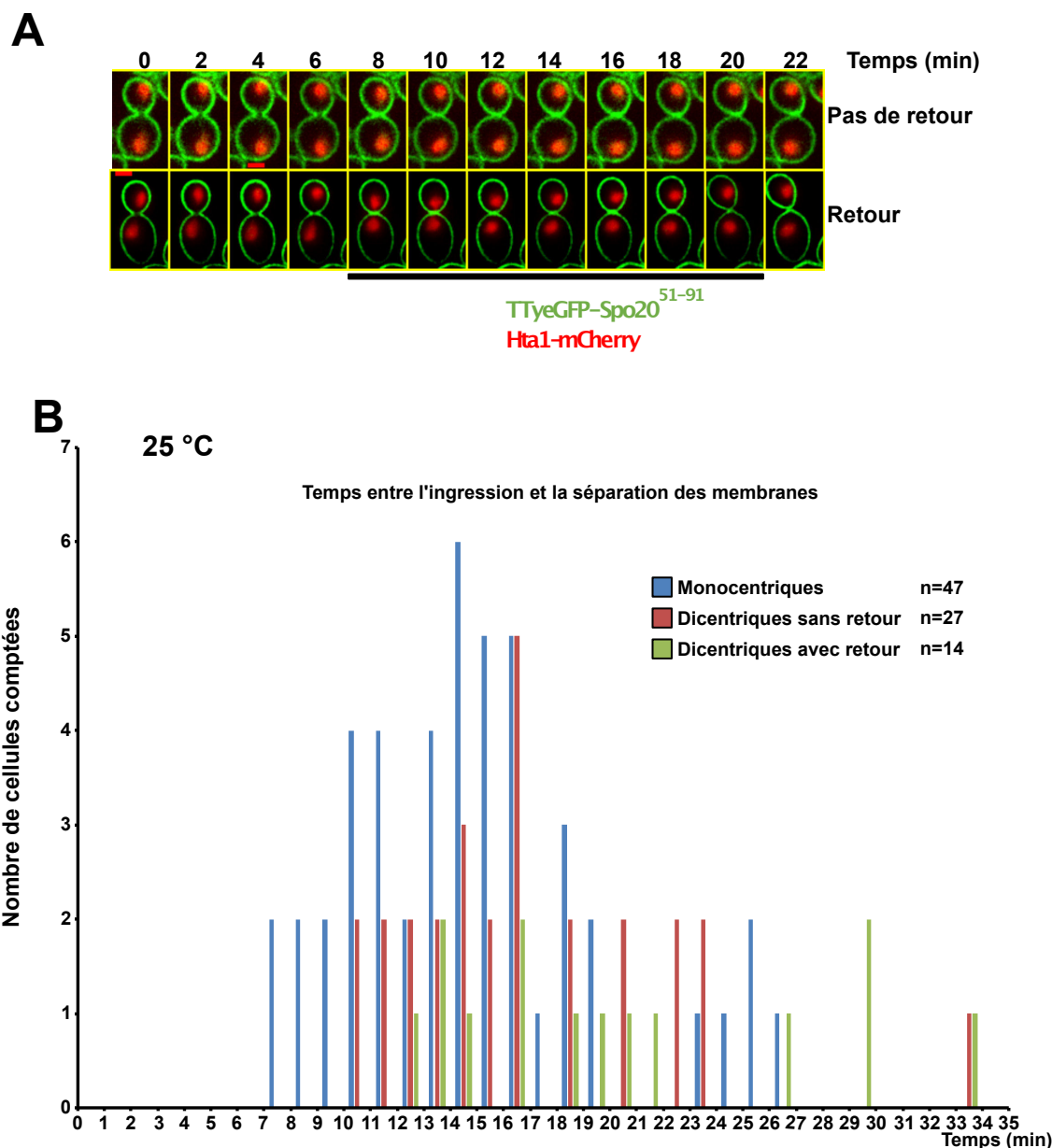


Figure 17. Le point de contrôle NoCut n'est pas activé par la présence de ponts induits par des chromosomes dicentriques

A) Des cellules possédant un dicentrique conditionnel fusionnant les chromosomes 6 et 7, un marquage de leurs membranes plasmiques par le marqueur TTyGFP-Spo20⁵¹⁻⁹¹ et de leurs chromatines par un tag Hta1-mCherry (souche YTG101 (YTG91 sp1003)) sont placées en croissance dans un milieu synthétique contenant du galactose puis chargées sur une plaque de microfluidique à 25 °C. Le milieu contenant du galactose est remplacé par un milieu synthétique contenant du glucose. Après 30 minutes, les cellules sont filmées selon les conditions décrites dans le matériel et méthode de l'article. La souche monocentrique (YTG91) est mise en croissance exponentielle en présence de glucose et est filmée dans cette

condition. Une image est acquise toutes les minutes. Une image sur deux est présentée. La barre d'échelle rouge représente 1 μm . La barre noire souligne les images montrant la fermeture des septa jusqu'à la séparation des cellules. B) Nombre de cellules comptées en fonction du temps entre l'ingression des membranes et la séparation.

NoCut ne retarde pas l'abscission en présence de ponts formés par des dicentriques et des ponts d'anaphase provoqués par un défaut de condensation

Nos expériences nous ont mené à observer la cassure de chromosomes dicentriques après déplétion des Condensines. Cependant, la perte des Condensines mène par elle-même à la formation d'un autre type de ponts d'anaphase, formés de chromatines non-ségrégées car non-condensées (Cuylen et al., 2011; Strunnikov et al., 1995). Ces ponts sont supposés déclencher le point de contrôle *NoCut*, s'il existe (Amaral et al., 2016; Mendoza et al., 2009). L'activation de *Nocut* en l'absence de Condensine est cependant déjà contestée (Cuylen et al., 2013). Nous nous sommes donc intéressé au temps entre la septation et la séparation de cellules présentant des ponts induits par une perte des Condensines dans les films utilisés **pour la Figure 4 de l'article présent dans ce manuscrit.**

Comme montré ici (**Figure 18**), la perte des condensines n'induit pas d'augmentation du temps d'abscission ni en présence ni en l'absence de chromosome dicentrique. La présence de ponts d'anaphase induits par un défaut de condensation ne semble donc pas retarder l'abscission de façon importante, contrairement à ce qui est montré par Amaral *et al.* (2016) et en accord avec les observations de Cuylen *et al.* (2013). Il n'est cependant pas possible d'exclure un délai de quelques minutes.

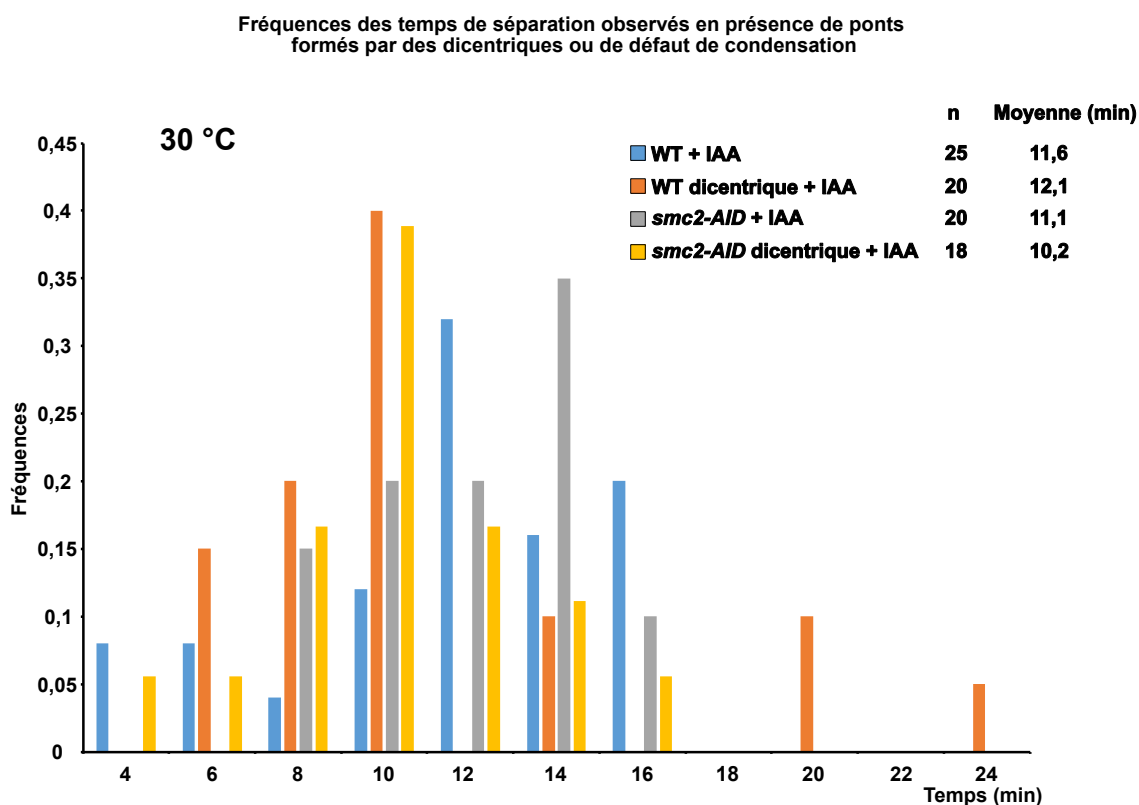


Figure 18. Une perte des condensines n’induit pas NoCut

Des cellules monocentriques WT (248-1c), *smc2-AID* (YTG208) et des cellules possédant un dicentrique conditionnel fusionnant les chromosomes 6 et 7 WT (248-1c *sp1003*), *smc2-AID* (YTG226), voir table des souches de l’article) sont placées en croissance exponentielle en présence de glucose ou de galactose respectivement. Après chargement sur plaque de microfluidique à 30 °C, le milieu est remplacé par du milieu synthétique contenant du glucose complémenté de 2 mM d’auxine (IAA). Après 30 minutes, les cellules sont filmées et le temps entre l’ingression et la séparation des membranes est déterminé pour chaque cellule grâce au marqueur membranaire *TTyeGFP-Spo20*⁵¹⁻⁹¹. Les fréquences de ces temps sont reportées sur l’histogramme. Une image toutes les deux minutes.

NoCut ne retarde pas l’abscission après un arrêt prolongé du cycle en phase S

Nous avons donc cherché à activer *NoCut* par un autre moyen tout en cherchant à vérifier son existence par une approche décrite par Amaral *et al.* (2016). Selon cette étude, l’arrêt prolongé en phase S provoqué par l’addition d’hydroxyurée provoquerait la formation de

ponts d'anaphase fait d'ADN non répliqué. *NoCut* retarderait alors l'abscission pour permettre la fin de la réplication et la ségrégation des chromosomes.

Nos observations montrent au contraire que les cellules dont la phase S a été ralentie par l'addition de 200 mM d'hydroxyurée (**Figure 19A**) ne présentent pas de retard d'abscission de plus de quelques minutes (**Figure 19B**). Il semble donc qu'un arrêt prolongé en phase S ne promeuve pas de délai de l'abscission, en contradiction de nouveau avec Amaral *et al.* (2016). Même si nous ne pouvons pas voir les ponts d'anaphase provoqués par l'hydroxyurée, il est manifeste que nos cellules exposées sont bloquées en phase S (**Figure 19A**). La relâche aurait donc dû induire la formation des mêmes ponts décrits par Amaral *et al.* (2016).

Un arrêt en S puis en G2 peut permettre la réparation des défauts provoqués par l'effondrement possible des fourches en présence de HU et ainsi engager la mitose qu'avec un génome intact.

En conclusion, dans les trois conditions différentes dans lesquelles nous avons pu former des ponts d'anaphase (dicentriques, défaut de condensation, et potentiels retards de réplication formant des ponts), nous n'avons pas observé l'activation de *NoCut* en accord avec plusieurs études plus anciennes (Baxter and Diffley, 2008; Cuylen et al., 2013; Lopez et al., 2015; Quevedo et al., 2012).

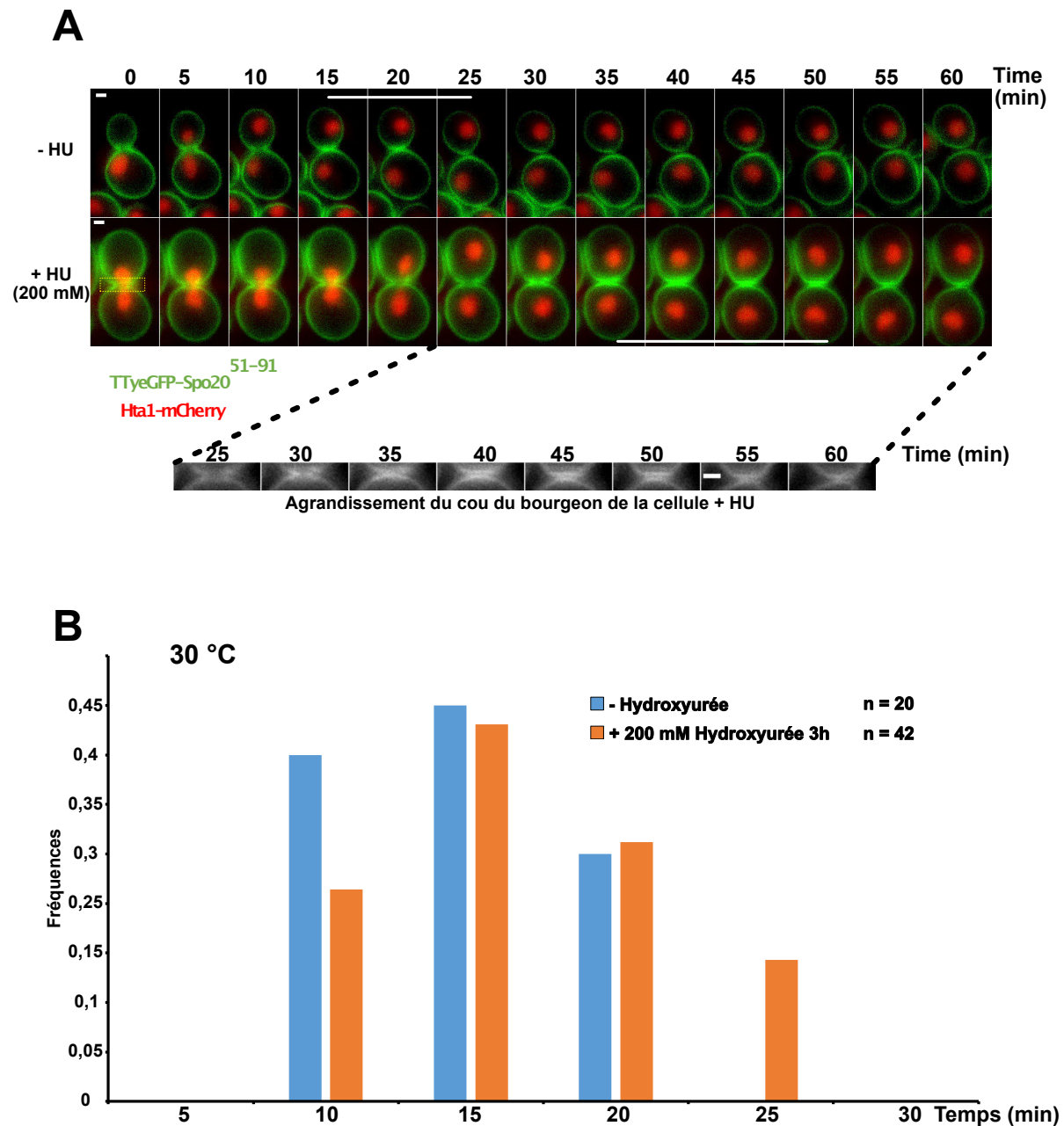


Figure 19. Un arrêt prolongé en phase S n'induit pas NoCut

A) Des cellules monocentriques (YTG91 : TTYeGFP-Spo20⁵¹⁻⁹¹ Hta1-mCherry BUD4) sont placées en croissance exponentielle en présence de glucose à 30°C. Après chargement des cellules dans une plaque de microfluidique, le milieu est renouvelé avec ou sans 200 mM d'hydroxyurée. Après 3 heures, l'hydroxyurée est lavée et les cellules sont filmées (1 image toutes les 5 minutes). Seules les cellules en phase S sont comptées dans la fraction de cellules bloquées. On détermine alors le temps entre l'ingression et la séparation des membranes plasmiques, indiqué dans cet exemple par une barre blanche. Barre d'échelle 1 μm.

B) La fréquence d'apparition des temps entre l'ingression et la séparation des membranes est reportée sur l'histogramme.

Mus81 et Yen1 ne sont pas responsables de la cassure des chromosomes dicentriques

Il est proposé que la nucléase LEM-3 soit responsables de la cassure des ponts d'anaphase non-résolus chez *C. elegans* (Hong et al., 2018a). De plus, Hong et al., (2018b) proposent que LEM-3 et Mus81 agissent de concert pour résoudre les intermédiaires de recombinaison en méiose. Il est possible que dans les autres organismes modèles, Yen1 et Mus81 aussi soient impliquées de la cassure des chromosomes dicentriques et autres ponts d'anaphase (Hong et al., 2018a).

J'ai donc testé une implication de Mus81 et de Yen1 dans la cassure des chromosomes dicentriques chez *S. cerevisiae*. Comme montré **Figure 20**, la cassure des chromosomes dicentriques a toujours lieu dans le double mutant *yen1Δ mus81Δ*. Il n'existe pas d'orthologue connu de LEM-3 chez *S. cerevisiae*. Cependant, ceci n'exclut pas l'implication d'autres nucléases. Enfin il est possible qu'une force générée par la fermeture des septa suffise à casser les ponts d'anaphase.

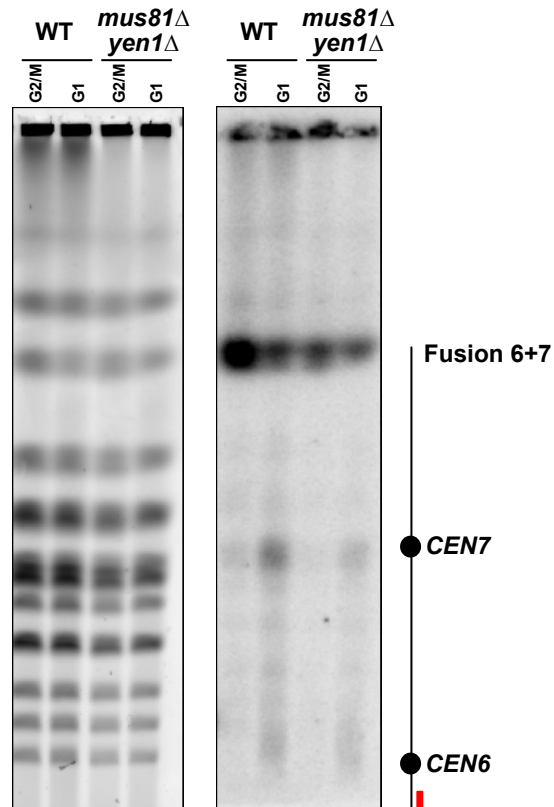


Figure 20. Les nucléases Mus81 et Yen1 ne sont pas essentielles pour la cassure des chromosomes dicentriques

Des cellules possédant un dicentrique conditionnel fusionnant les chromosomes 6 et 7 WT (*lev801*) et *mus81* Δ *yen1* Δ (*lvl156-mus81* Δ) en croissance exponentielle en présence de galactose sont arrêtées en phase G1 par l'addition de facteur α . Les cellules sont ensuite libérées dans le cycle en présence de glucose et arrêtées soit en phase G2 par l'ajout de nocodazole, soit dans la phase G1 suivante par l'ajout de novo de facteur α . Les chromosomes sont séparés par électrophorèse en champs pulsé et le chromosome 6 est hybridé par une sonde spécifique.

Discussion

Ce travail décrit le rôle des Condensines dans l'établissement des points chauds de cassure pericentromériques des chromosomes dicentriques. Il propose que les Condensines génèrent une force capable de ramener les régions péricentromériques au site de constriction. Ce mouvement favoriserait le positionnement des régions proches des centromères au site de septation. La croissance des septa provoquerait alors leur rupture.

Ce travail propose également que des séquences télomériques internes liant Rap1 sont une barrière à la formation des boucles par Condensine lors de l'anaphase. Cette obstruction dépendrait de la fixation répétée de protéines à forte affinité sur l'ADN. Ainsi, ce *roadblock* entrainerait l'isolation de deux domaines topologiques sur le chromosome par les séquences liant Rap1. La présence de ces deux domaines favoriserait le positionnement de la séquences télomérique interne des dicentriques au site de constriction ce qui provoquerait leur rupture à cette position. Ces résultats montrent également que les chromosomes dicentriques sont rompus sans entrainer de délai de la septation.

Formation de domaines topologiques par Condensine

La formation des domaines topologiques dépend-t-elle de Condensine ?

Condensine est responsable de l'augmentation des interactions intrachromosomiques en anaphase (Lazar-Stefanita et al., 2017). Nous inférons donc que la formation des domaines topologiques observés de part et d'autre des sites Rap1/lacO dépend des Condensines. Cependant, s'il est possible d'établir une corrélation entre la présence du point chaud télomérique (ou lacO/lacI) dans un dicentrique et la présence d'un insulateur, il n'est pas démontré que ces domaines dépendent de la présence de Condensines.

En effet, il est important de noter que si les phénomènes de formation d'un point chaud de rupture des chromosomes dicentriques par des séquences télomériques internes et la formation de deux domaines topologiques sont corrélés, nous ne pouvons être certains que les deux phénomènes ne soient pas en partie indépendants. Cependant, tous deux dépendent de la fixation d'une protéine en tandem avec une haute affinité. Il est primordial de déterminer si ces domaines topologiques disparaissent après dégradation des Condensines en anaphase. Cette expérience sera faite par Hi-C comme dans la **Figure 6 de l'article** après dégradation des Condensines dans une souche *smc2-AID* arrêtée en anaphase. Une disparition des

domaines topologiques renforcera la corrélation entre capacité d'une séquence à isoler des domaines et capacité à favoriser la cassure d'un chromosome dicentrique.

Comment Condensine et Rap1 peuvent former des domaines topologiques ?

In vitro, Condensine forme des boucles de manière unidirectionnelle (Ganji et al., 2018). Cette extrusion nécessite la présence d'un site de fixation de Condensine fort et relativement stable, probablement formé par la « ceinture de sécurité » Ycg1/Brn1 (Kschonsak et al., 2017). En effet, une fois cette ceinture refermée, l'affinité est grande et le glissement spontané de Condensine improbable car le diamètre de la poche n'autorise pas passage d'un nucléosome (Cuylen et al., 2011; Kschonsak et al., 2017). Un autre domaine de Condensine, peut-être le *hinge* (Soh et al., 2015), aurait pour rôle d'interagir transitoirement avec l'ADN pour ramener un locus plus distant au niveau de la base du complexe et ainsi élargir la boucle au fil de cycles de « capture-traction ». Si un trop grand nombre de protéines de haute affinité bloque cet ancrage temporaire, l'extrusion d'une boucle est alors compromise.

On peut imaginer qu'aux séquences télomériques, la haute affinité de Rap1 pour l'ADN bloque l'extrusion de boucles par Condensine. Ce phénomène est amplifié par le fait que 300 pb liant Rap1 rigidifient l'ADN sur 100 nm environ. Condensine mesure environ 50 nm du *hinge* à la kleisine Brn1 et forme donc un anneau d'un diamètre inférieur. La capture de l'ADN par le complexe pourrait donc être bloquée sur des télomères internes, par l'éloignement qu'implique la rigidification de la séquence. En accord avec ce modèle, un point chaud de cassure des dicentriques apparaît à partir de 6 sites Rap1 (environs 30 à 40 nm) ce qui correspond à une longueur compatible avec le diamètre interne de Condensine.

On peut alors formuler plusieurs hypothèses testables :

- La rigidité et la proximité des sites sont-elles nécessaires pour la formation d'un point chaud télomérique de cassure des dicentriques ? Des sites Rap1 légèrement espacés pourraient impliquer une perte de rigidité de la séquence et le dégagement d'une place entre les sites permettant l'interaction transitoire avec Condensine. Une prédiction est donc que ces sites espacés ne devraient plus promouvoir ni la formation d'un point chaud de cassure des chromosomes dicentriques ni d'isolement topologique.
- La haute affinité de Rap1 est-elle suffisante pour former un point chaud ? L'utilisation d'un mutant du DBD de Rap1 ayant une plus faible affinité pour l'ADN (Feldmann et al., 2015b; Matot et al., 2012) permettrait de renforcer l'idée que Rap1 forme un point chaud uniquement du fait de sa haute capacité de fixation, exactement comme lacI.

Notons que la rigidification de la chromatine par des protéines lacI fixées en tandem reste inexplorée et doit être testée.

- Les tailles relatives des séquences Rap1 et des Condensines sont-elles responsables du point chaud ? Chez *B. subtilis*, des complexes Smc dont la longueur des *coiled-coil* a été modifiée conservent leur activité ATPase et assurent la survie des cellules (Bürmann et al., 2017). Ce même type de construction pourrait être créé chez *S. cerevisiae* pour étudier le *roadblock* de Condensine par les télomères internes. Une prédiction est qu'en cas de *coiled-coil* plus courts, le nombre de site Rap1 nécessaires pour bloquer Condensine serait moins grand, l'inverse serait également vrai.

Enrichissement de Condensine aux extrémités des séquences Rap1

On peut imaginer qu'un *roadblock* de Condensine implique une migration et une accumulation des complexes de part et d'autre de la séquence télomérique interne.

Pour extruder une boucle, Condensine a besoin de s'attacher provisoirement à l'ADN. Il n'est pas certain que l'on puisse détecter la fixation transitoire de Condensine à l'ADN lors de l'extrusion. Il est possible que l'attachement en ceinture de sécurité (Cuylen et al., 2013; Kschonsak et al., 2017) soit la principale source du signal observable par ChIP et qu'il limite les possibilités de détection d'une interaction transitoire. Ainsi, si l'interaction transitoire est bloquée par Condensine, alors il n'est pas certain que l'on en détecte une plus grande quantité aux bornes du *roadblocker*.

Les mutants d'activité ATPase de Condensine ont la possibilité de se fixer sur l'ADN sans être capable de former de boucle et de condenser l'ADN (Thadani et al., 2018). Comparer leur profil de fixation par ChIP à celui de Condensine sauvage permettrait de regarder s'il est possible de détecter l'attachement transitoire à l'ADN lors de la formation de la boucle. De plus, le maintien d'un point chaud dans ces conditions serait signe qu'une activité de condensation n'est pas nécessaire et qu'un simple effet de chargement de Condensine est responsable du point chaud.

Un nouvel outil d'étude de la régulation de Condensine

Enfin, les chromosomes dicentriques pourraient devenir un outil permettant l'étude de la condensation et de sa régulation *in vivo*.

L'activation du MEN promeut la cytodièrese et est concomitante avec la décondensation du rDNA (Varela et al., 2009). Cependant, le retour des SPBs dépendant des Condensines signifie que la condensation est encore possible après activation du MEN. Il serait intéressant

de tester si un maintien de l'activité de Condensine en télophase est augmenté de la présence d'un pont.

De plus, il est possible de chercher les régulateurs responsables du maintien tardif de l'activité de Condensine dans le cycle. Plusieurs kinases sont responsables de la promotion de l'augmentation de Condensine au cours du cycle (CDK1, Cdc5, Ipl1). Tester le maintien de la présence des points chauds péracentromériques dans des mutants de ces régulateurs pourrait être un moyen de discriminer les facteurs responsables de la régulation des Condensines.

De plus, le renouvellement des Condensines sur l'ADN semble être essentiel à une condensation normale des chromosomes en mitose. La nécessité de ce renouvellement pourrait être testée dans des mutants de la ségrégase Cdc48, dans laquelle ce renouvellement est réduit (Thattikota et al., 2018). Il est aussi possible que dans ces mutants, les Condensines migrent jusqu'au *roadblocker* sans possibilité d'être décrochées et s'empilent ainsi, induisant un maintien du point chaud télomérique malgré une condensation incomplète des chromosomes.

Deux modèles expliquant la condensation

L'activité d'extrusion de boucles par Condensine n'est montrée qu'*in vitro*. S'il est probable que Condensine extrude des boucle *in vivo* (Gibcus et al., 2018), il reste possible que Condensine forme également des boucles en entourant deux loci distants d'une chromatide (modèle de réticulation stochastique *cf: introduction*). Si ces deux mécanismes co-existent *in vivo*, il s'agirait alors de déterminer leur prévalence d'implication dans le processus de condensation.

Nos données proposent un blocage de la progression de Condensine par Rap1 et semblent peu compatibles avec un modèle majoritaire de crosslink. En effet, nous montrons des domaines topologiques pouvant dépendre des Condensines alors qu'une réticulation stochastique tendrait à générer des contacts de part et d'autre des séquences télomériques.

Il serait cependant intéressant de confirmer qu'*in vitro* des sites en tandem fixés par Rap1 ou lacI bloquent l'extrusion d'une boucle sur une molécule unique d'ADN (Ganji et al., 2018). Un blocage pourrait signifier que le modèle d'extrusion de boucles domine dans les cellules.

Rap1 : une barrière des extrudeurs de boucles ?

Nous supposons que Rap1 pourrait bloquer l'extrusion de boucles par Condensine. Il serait intéressant de tester si Rap1 agit de même sur autres complexes Smc.

En anaphase, la majorité des complexes Cohésine sont dégradés par la séparase Esp1 (Uhlmann et al., 1999) et par la traction exercée par le fuseau mitotique sur les bras des chromosomes (Renshaw et al., 2010). Il est donc improbable que Cohésine soit responsable de la formation des domaines que nous observons en fin d'anaphase, même si cela reste à tester.

En interphase, Cohésine contribue à l'organisation du génome (Lazar-Stefanita et al., 2017; Schalbetter et al., 2017). Il est supposé que ce complexe pourrait également être capable d'extruder une boucle d'ADN ou de glisser dessus (Fudenberg et al., 2016). Il serait intéressant de regarder la capacité des séquences télomériques à former des domaines topologiques en G1 ou en S et de voir s'ils dépendent de Cohésine. D'autant qu'il est connu que le complexe Cohésine chez le mammifère est bloqué par le répresseur transcriptionnel CTCF qui jouerait un rôle de barrière (Davidson et al., 2016). Chez *S. cerevisiae*, il n'y a ni équivalent de CTCF ni domaine topologique visible en Hi-C dépendant de Cohésine lors d'un cycle mitotique (Lazar-Stefanita et al., 2017; Schalbetter et al., 2017). Des domaines sont observés en méiose (Muller et al., 2018).

Il est possible que des protéines Rap1 en tandem soient capables de bloquer le glissement de Cohésine sur l'ADN et la formation de boucles. Cependant, les mécanismes permettant le blocage de Condensine par des sites Rap1 et le blocage par CTCF fixé à son site, chez les vertébrés, sont probablement différents. En effet, Cohésine est bloqué par une molécule unique, peut-être à cause d'une contrainte stérique due à sa taille ou à cause d'une interaction avec PDS5, une sous-unité de Cohésine (Davidson et al., 2016; Kanke et al., 2016). Dans le cas de notre étude, le fait que l'intensité du point chaud télomérique augmente avec le nombre de Rap1 laisse penser que la barrière vient plus probablement de l'impossibilité de passer une séquence rigidifiée ou dont l'ADN n'est plus accessible, que d'une interaction spécifique avec Rap1 ou de la taille d'un monomère de Rap1 (approximativement 12 nm de diamètre en solution (Williams et al., 2010)).

Reproductibilité de *NoCut*

Nous n'observons pas de retard prolongé de l'abscission en présence de ponts provoqués par :

i) des chromosomes dicentriques, ii) une perte de la condensation et iii) de potentiels problèmes de réplication provoqués par un ralentissement de la phase S.

Nous avons observé des ponts d'anaphase dans les cellules dans lesquelles nous induisons un défaut de condensation (à l'aide d'un tag histone, non montré). Malgré cela, nous n'observons

pas l'arrêt de plusieurs dizaines de minutes décrit par Amaral *et al.* (2016). D'après nos données et la méthode employée pour déterminer le temps d'abscission, nous ne pouvons exclure un délai de quelques minutes provoqué par ces ponts. Ces résultats confirment que la présence de ponts d'anaphase n'inhibe pas l'abscission de façon notable, conformément à ce qui est publié dans (Baxter and Diffley, 2008; Cuylen *et al.*, 2013; Quevedo *et al.*, 2012).

Après un maintien prolongé du cycle en phase S par l'hydroxyurée, aucun pont persistant n'est observable à l'aide d'un tag histone-FP sur nos images au moment de la cytodierèse. Au contraire, Amaral *et al.* (2016) montrent des ponts d'ADN double brins visibles en DAPI. Il est donc possible que les éventuels problèmes de réplication et les régions simple-brin aient été réparés après détection par le point de contrôle intra-S ou G2/M. Ceci aurait conduit à analyser des cellules ne présentant pas de pont malgré un traitement de 3h avec 200 mM HU. Pour favoriser la formation de ponts, il serait intéressant de bloquer la réparation des défauts de réplication potentiellement induits par l'hydroxyurée en abolissant les points de contrôle de réplication et de détection des dommages à l'ADN par exemple un mutant *mec1* ou *rad53*. Nous pouvons également envisager de reproduire les expériences avec une souche utilisée par Amaral *et al.* (2016). Il est également possible que la souche utilisée à l'origine présente un retard de réplication important, même en l'absence de stress exogène (Ivanova *et al.*, 2018) en contraste avec d'autres souches étudiées (Ebrahimi and Donaldson, 2008).

On note qu'une altération du mécanisme d'abscission semble favoriser un délai pouvant apparaître comme une activation de *NoCut*. En effet, le ralentissement de l'APC dans un mutant *cdh1Δ* favorise un délai d'abscission en présence de ponts dicentriques (Amaral *et al.*, 2016). De plus, les seules souches ayant pour l'instant permis l'observation de *NoCut* semblent posséder un suppresseur permettant la génération d'un double mutant viable *boi1Δ boi2Δ* (Masgrau *et al.*, 2017). Cette mutation affecte le gène *EXO70* qui est impliqué dans la formation des septa. En effet, Exo70 est un membre de l'exocyste essentiel à l'export de protéines et molécules nécessaires à la cytodierèse. Il serait intéressant de voir si la fonction de cytodierèse n'est pas tellement altérée dans ce mutant que la présence d'un pont d'anaphase provoque un arrêt de la cytodierèse. Il est possible que la souche WT de référence utilisée dans ce laboratoire soit affectée pour la synthèse du septum. Une synergie avec la présence anormale de ponts empêche totalement l'arrivée à terme du mécanisme. Ainsi, le phénotype sauvage serait « *Cut* » et « *NoCut* » celui de ce mutant particulier. De plus, ceci renforce l'hypothèse que le septum est responsable de la cassure des chromosomes dicentriques par la force physique qu'implique sa croissance. Il serait donc intéressant

d'explorer davantage ce processus anormal même si l'existence chez les levures d'un checkpoint capable de retarder l'abscission en réponse à des problèmes de ségrégation semble aujourd'hui improbable.

De plus, l'arrêt en *NoCut*, s'il existe est incapable de sauver un défaut de condensation ou de topoisomérase. La section de l'ADN permet par contre de donner une chance de survie à la cellule qui reçoit la totalité du matériel génétique après une mauvaise ségrégation (Machín et al., 2016). La section des chromosomes dicentriques formés par fusion restaure également la viabilité de la mère et de la fille dans 40% des cas (Pobiega and Marcand, 2010) montrant qu'une cellule peut avoir un avantage sélectif à couper ses ponts d'anaphase.

Rupture des chromosomes dicentriques chez *S. cerevisiae*

Trois hypothèses existent pour expliquer comment les chromosomes dicentriques peuvent être cassés :

- Une nucléase pourrait digérer les ponts.
- Une force physique générée par le septum pourrait rompre les ponts.
- L'action combinée des deux pourrait être responsable de leur rupture.

L'objectif initial de ma thèse était de trouver le mécanisme responsable de la cassure des chromosomes dicentriques. Les nucléases Nuc1, Exo1, Mre11/Sae2, Slx4, Yen1, Mus81, Pms1, Rad1, Rad2, Rad27, Apn1, Apn2, les topoisomérases Top1, Top2(-AID) et Top3, et l'hélicase Sgs1 avait été testées avant mon arrivée au laboratoire. Elles ne sont pas nécessaires à la cassure des dicentriques (V. Lopez et S. Marcand, données non publiées).

Cependant, elles ont toutes été testées en simple mutation ce qui signifie qu'une redondance reste possible.

Les nucléases TREX1 et LEM-3 favorisent la digestion des ponts d'anaphase dans les cellules HeLa ou chez *C. elegans* respectivement. Elles n'ont pas d'orthologue connu chez la levure. Cependant, le fait que LEM-3 agissent de concert avec Mus81 pour permettre la recombinaison méiotique (Hong et al., 2018b) suggère que Mus81 et Yen1 puissent digérer les chromosomes dicentriques en mitose chez *S. cerevisiae* (Hong et al., 2018a). De plus, leur activation en anaphase faisaient de ces nucléases de bons candidats pour ce rôle et leur redondance pouvait expliquer l'absence de phénotype des simples mutants *yen1Δ* et *mus81Δ* précédemment observée.

Le double mutant *mus81Δ yen1Δ* n'affecte pas non plus la cassure des chromosomes dicentriques (**Figure 20**). Toutefois il est possible qu'une troisième nucléase agisse de façon

redondante. En effet, l'activité de LEM-3 est également partiellement redondante avec Slx4 (Hong et al., 2018b). Les nucléases Yen1, Mus81 et Slx4 reconnaissent les flaps et jonctions de Holliday pour les cliver et permettre la recombinaison (Matos and West, 2014). Elles pourraient donc peut-être reconnaître la double hélice soumise à une contrainte mécanique induite par un écrasement par les septa en croissance.

Pour déterminer si une force de croissance de la septation était nécessaire à la cassure des dicentriques, j'ai testé plusieurs facteurs impliqués dans le processus de septation :

- Fks1 et Fks2, les glucanes synthétases responsables de la synthèse du septum secondaire. Ces deux protéines ne sont pas essentielles individuellement et leur fonction est partiellement redondante. Le double mutant *fks1Δ fks2Δ* n'est pas viable.
- Crh1 et Crh2, responsables du pontage (*crosslink*) entre les chaînes de glucane. Le double mutant *crh1Δ crh2Δ* est viable et possède une paroi cellulaire moins rigide (Dague et al., 2010).
- Myo1. Les cellules dépourvues de Myo1 ne forment pas de septum primaire. Un septum secondaire compensatoire grossissant de manière anarchique permet la septation et l'abscission.
- Tus1. Les cellules dépourvues de Tus1 ne forment que du septum primaire et leur taux de cytodierèse réussies est très faible.

Mon objectif était de tenter d'affaiblir la cytodierèse (Bhavsar-Jog and Bi, 2017; Weiss, 2012) pour l'empêcher de casser l'ADN. Toutes ces approches se sont révélées infructueuses et ne permettent que de conclure que la fréquence de cassure d'un dicentrique corrèle avec la capacité à « réussir la cytodierèse ». Par exemple, en l'absence de Tus1, on observe dans une large proportion la formation de chaînes de cellules non-séparées et un faible pourcentage de dicentriques cassés.

La cassure fréquente des dicentriques en l'absence de Myo1 montre toutefois qu'une nucléase n'est pas recrutée par l'anneau d'actomyosine, comme l'est LEM-3 (Hong et al., 2018a).

En conclusion, nos données vont dans le sens d'une rupture des dicentriques par l'application d'une force générée par la croissance des septa sur l'ADN. Cependant nous ne pouvons pas exclure un recrutement et l'implication d'une nucléase au cours de ce processus.

Bibliographie

Abdallah, P., Luciano, P., Runge, K.W., Lisby, M., Géli, V., Gilson, E., and Teixeira, M.T. (2009). A two step model for senescence triggered by a single critically short telomere. *Nat. Cell Biol.* *11*, 988–993.

Akai, Y., Kurokawa, Y., Nakazawa, N., Tonami-Murakami, Y., Suzuki, Y., Yoshimura, S.H., Iwasaki, H., Shiroya, Y., Nakamura, T., Shibata, E., et al. (2011). Opposing role of condensin hinge against replication protein A in mitosis and interphase through promoting DNA annealing. *Open Biol.* *1*.

Amaral, N., Vendrell, A., Funaya, C., Idrissi, F.-Z., Maier, M., Kumar, A., Neurohr, G., Colomina, N., Torres-Rosell, J., Geli, M.-I., et al. (2016). The Aurora-B-dependent NoCut checkpoint prevents damage of anaphase bridges after DNA replication stress. *Nat. Cell Biol.* *18*, 516–526.

Amaral, N., Brownlow, N., and Mendoza, M. (2017). DNA replication stress: NoCut to the rescue. *Cell Cycle Georget. Tex* *16*, 233–234.

Azad, G.K., Singh, V., Baranwal, S., Thakare, M.J., and Tomar, R.S. (2015). The transcription factor Rap1p is required for tolerance to cell-wall perturbing agents and for cell-wall maintenance in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* *589*, 59–67.

Azvolinsky, A., Giresi, P.G., Lieb, J.D., and Zakian, V.A. (2009). Highly transcribed RNA polymerase II genes are impediments to replication fork progression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell* *34*, 722–734.

Baro, B., Queralt, E., and Monje-Casas, F. (2017). Regulation of Mitotic Exit in *Saccharomyces cerevisiae*. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* *1505*, 3–17.

Barra, V., and Fachinetti, D. (2018). The dark side of centromeres: types, causes and consequences of structural abnormalities implicating centromeric DNA. *Nat. Commun.* *9*, 4340.

Baxter, J., and Diffley, J.F.X. (2008). Topoisomerase II Inactivation Prevents the Completion of DNA Replication in Budding Yeast. *Mol. Cell* *30*, 790–802.

Baxter, J., Sen, N., Martínez, V.L., Carandini, M.E.M.D., Schvartzman, J.B., Diffley, J.F.X., and Aragón, L. (2011). Positive Supercoiling of Mitotic DNA Drives Decatenation by Topoisomerase II in Eukaryotes. *Science* *331*, 1328–1332.

Bazile, F., St-Pierre, J., and D'Amours, D. (2010). Three-step model for condensin activation during mitotic chromosome condensation. *Cell Cycle* *9*, 3263–3275.

Benarroch-Popivker, D., Pisano, S., Mendez-Bermudez, A., Lototska, L., Kaur, P., Bauwens, S., Djerbi, N., Latrick, C.M., Fraissier, V., Pei, B., et al. (2016). TRF2-Mediated Control of

Telomere DNA Topology as a Mechanism for Chromosome-End Protection. *Mol. Cell* 61, 274–286.

Bender, L.B., Suh, J., Carroll, C.R., Fong, Y., Fingerman, I.M., Briggs, S.D., Cao, R., Zhang, Y., Reinke, V., and Strome, S. (2006). MES-4: an autosome-associated histone methyltransferase that participates in silencing the X chromosomes in the *C. elegans* germ line. *Dev. Camb. Engl.* 133, 3907–3917.

Bendjennat, M., and Weil, P.A. (2008). The Transcriptional Repressor Activator Protein Rap1p Is a Direct Regulator of TATA-binding Protein. *J. Biol. Chem.* 283, 8699–8710.

Bernard, P., and Vanoosthuyse, V. (2015). Does transcription play a role in creating a condensin binding site? *Transcription* 6, 12–16.

Bétermier, M., Bertrand, P., and Lopez, B.S. (2014). Is Non-Homologous End-Joining Really an Inherently Error-Prone Process? *PLOS Genet.* 10, e1004086.

Bhalla, N., Biggins, S., and Murray, A.W. (2002). Mutation of YCS4, a Budding Yeast Condensin Subunit, Affects Mitotic and Nonmitotic Chromosome Behavior. *Mol. Biol. Cell* 13, 632–645.

Bhavsar-Jog, Y.P., and Bi, E. (2017). Mechanics and regulation of cytokinesis in budding yeast. *Semin. Cell Dev. Biol.* 66, 107–118.

Biggins, S., Bhalla, N., Chang, A., Smith, D.L., and Murray, A.W. (2001). Genes involved in sister chromatid separation and segregation in the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 159, 453–470.

Blanco, N., Sanz, A.B., Rodríguez-Peña, J.M., Nombela, C., Farkaš, V., Hurtado-Guerrero, R., and Arroyo, J. (2015). Structural and functional analysis of yeast Crh1 and Crh2 transglycosylases. *FEBS J.* 282, 715–731.

Blasco, M.A. (2005). Telomeres and human disease: ageing, cancer and beyond. *Nat. Rev. Genet.* 6, 611–622.

Bonetti, D., Martina, M., Falcettoni, M., and Longhese, M.P. (2014). Telomere-end processing: mechanisms and regulation. *Chromosoma* 123, 57–66.

Brito, I.L., Monje-Casas, F., and Amon, A. (2010). The Lrs4-Csm1 monopolin complex associates with kinetochores during anaphase and is required for accurate chromosome segregation. *Cell Cycle* 9, 3611–3618.

Buck, M.J., and Lieb, J.D. (2006). A chromatin-mediated mechanism for specification of conditional transcription factor targets. *Nat. Genet.* 38, 1446–1451.

Buck, S.W., and Shore, D. (1995). Action of a RAP1 carboxy-terminal silencing domain reveals an underlying competition between HMR and telomeres in yeast. *Genes Dev.* 9, 370–384.

Bupp, J.M., Martin, A.E., Stensrud, E.S., and Jaspersen, S.L. (2007). Telomere anchoring at

the nuclear periphery requires the budding yeast Sad1-UNC-84 domain protein Mps3. *J. Cell Biol.* 179, 845–854.

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

Cabib, E. (2009). Two Novel Techniques for Determination of Polysaccharide Cross-Links Show that Crh1p and Crh2p Attach Chitin to both $\beta(1-6)$ - and $\beta(1-3)$ Glucan in the *Saccharomyces cerevisiae* Cell Wall. *Eukaryot. Cell* 8, 1626–1636.

Callebaut, I., and Mornon, J.-P. (1997). From BRCA1 to RAP1: a widespread BRCT module closely associated with DNA repair. *FEBS Lett.* 400, 25–30.

Candelli, T., Challal, D., Briand, J.-B., Boulay, J., Porrua, O., Colin, J., and Libri, D. (2018). High-resolution transcription maps reveal the widespread impact of roadblock termination in yeast. *EMBO J.* 37, e97490.

Caviston, J.P., Longtine, M., Pringle, J.R., and Bi, E. (2003). The Role of Cdc42p GTPase-activating Proteins in Assembly of the Septin Ring in Yeast. *Mol. Biol. Cell* 14, 4051–4066.

Challal, D., Barucco, M., Kubik, S., Feuerbach, F., Candelli, T., Geoffroy, H., Benaksas, C., Shore, D., and Libri, D. (2018). General Regulatory Factors control the fidelity of transcription by restricting non-coding and ectopic initiation. *BioRxiv* 331793.

Chan, S.W.-L., and Blackburn, E.H. (2003). Telomerase and ATM/Tel1p protect telomeres from nonhomologous end joining. *Mol. Cell* 11, 1379–1387.

Charbin, A., Bouchoux, C., and Uhlmann, F. (2014). Condensin aids sister chromatid decatenation by topoisomerase II. *Nucleic Acids Res.* 42, 340–348.

Cheng, T.M., Heeger, S., Chaleil, R.A., Matthews, N., Stewart, A., Wright, J., Lim, C., Bates, P.A., and Uhlmann, F. (2015). A simple biophysical model emulates budding yeast chromosome condensation.

Ciosk, R., Shirayama, M., Shevchenko, A., Tanaka, T., Toth, A., Shevchenko, A., and Nasmyth, K. (2000). Cohesin's binding to chromosomes depends on a separate complex consisting of Scc2 and Scc4 proteins. *Mol. Cell* 5, 243–254.

Ciullo, M., Debily, M.-A., Rozier, L., Autiero, M., Billault, A., Mayau, V., El Marhomy, S., Guardiola, J., Bernheim, A., Coullin, P., et al. (2002). Initiation of the breakage–fusion–bridge mechanism through common fragile site activation in human breast cancer cells: the model of PIP gene duplication from a break at FRA7L. *Hum. Mol. Genet.* 11, 2887–2894.

Clemente-Blanco, A., Mayán-Santo, M., Schneider, D.A., Machín, F., Jarmuz, A., Tschochner, H., and Aragón, L. (2009). Cdc14 inhibits transcription by RNA polymerase I during anaphase. *Nature* 458, 219–222.

Clemente-Blanco, A., Sen, N., Mayan-Santos, M., Sacristán, M.P., Graham, B., Jarmuz, A., Giess, A., Webb, E., Game, L., Eick, D., et al. (2011). Cdc14 phosphatase promotes

segregation of telomeres through repression of RNA polymerase II transcription. *Nat. Cell Biol.* *13*, 1450–1456.

Cobbe, N., and Heck, M.M.S. (2006). The evolution of ATPase activity in SMC proteins. *Proteins* *63*, 685–696.

Cockell, M., Palladino, F., Laroche, T., Kyrion, G., Liu, C., Lustig, A.J., and Gasser, S.M. (1995). The carboxy termini of Sir4 and Rap1 affect Sir3 localization: evidence for a multicomponent complex required for yeast telomeric silencing. *J. Cell Biol.* *129*, 909–924.

Conrad, M.N., Wright, J.H., Wolf, A.J., and Zakian, V.A. (1990). RAP1 protein interacts with yeast telomeres in vivo: Overproduction alters telomere structure and decreases chromosome stability. *Cell* *63*, 739–750.

Crane, E., Bian, Q., McCord, R.P., Lajoie, B.R., Wheeler, B.S., Ralston, E.J., Uzawa, S., Dekker, J., and Meyer, B.J. (2015). Condensin-Driven Remodeling of X-Chromosome Topology during Dosage Compensation. *Nature* *523*, 240–244.

Croll, D., Zala, M., and McDonald, B.A. (2013). Breakage-fusion-bridge Cycles and Large Insertions Contribute to the Rapid Evolution of Accessory Chromosomes in a Fungal Pathogen. *PLoS Genet.* *9*.

Cuvier, O., and Hirano, T. (2003). A role of topoisomerase II in linking DNA replication to chromosome condensation. *J. Cell Biol.* *160*, 645–655.

Cuylen, S., Metz, J., and Haering, C.H. (2011). Condensin structures chromosomal DNA through topological links. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *18*, 894–901.

Cuylen, S., Metz, J., Hruby, A., and Haering, C.H. (2013). Entrapment of Chromosomes by Condensin Rings Prevents Their Breakage during Cytokinesis. *Dev. Cell* *27*, 469–478.

Dague, E., Bitar, R., Ranchon, H., Durand, F., Yken, H.M., and François, J.M. (2010). An atomic force microscopy analysis of yeast mutants defective in cell wall architecture. *Yeast* *27*, 673–684.

D'Ambrosio, C., Schmidt, C.K., Katou, Y., Kelly, G., Itoh, T., Shirahige, K., and Uhlmann, F. (2008). Identification of cis-acting sites for condensin loading onto budding yeast chromosomes. *Genes Dev.* *22*, 2215–2227.

D'Amours, D., Stegmeier, F., and Amon, A. (2004). Cdc14 and condensin control the dissolution of cohesin-independent chromosome linkages at repeated DNA. *Cell* *117*, 455–469.

Davidson, I.F., Goetz, D., Zaczek, M.P., Molodtsov, M.I., Veld, P.J.H. in 't, Weissmann, F., Litos, G., Cisneros, D.A., Ocampo-Hafalla, M., Ladurner, R., et al. (2016). Rapid movement and transcriptional re-localization of human cohesin on DNA. *EMBO J.* *35*, 2671–2685.

Dehé, P.-M., Dichtl, B., Schaft, D., Roguev, A., Pamblanco, M., Lebrun, R., Rodríguez-Gil, A., Mkandawire, M., Landsberg, K., Shevchenko, A., et al. (2006). Protein interactions within the Set1 complex and their roles in the regulation of histone 3 lysine 4 methylation. *J. Biol.*

Chem. 281, 35404–35412.

Del Vescovo, V., De Sanctis, V., Bianchi, A., Shore, D., Di Mauro, E., and Negri, R. (2004). Distinct DNA Elements Contribute to Rap1p Affinity for its Binding Sites. *J. Mol. Biol.* 338, 877–893.

Diebold-Durand, M.-L., Lee, H., Ruiz Avila, L.B., Noh, H., Shin, H.-C., Im, H., Bock, F.P., Bürmann, F., Durand, A., Basfeld, A., et al. (2017). Structure of Full-Length SMC and Rearrangements Required for Chromosome Organization. *Mol. Cell* 67, 334–347.e5.

Dobbelaere, J., and Barral, Y. (2004). Spatial Coordination of Cytokinetic Events by Compartmentalization of the Cell Cortex. *Science* 305, 393–396.

Doughty, T.W., Arsenault, H.E., and Benanti, J.A. (2016). Levels of Ycg1 Limit Condensin Function during the Cell Cycle. *PLoS Genet.* 12, e1006216.

Ebrahimi, H., and Donaldson, A.D. (2008). Release of yeast telomeres from the nuclear periphery is triggered by replication and maintained by suppression of Ku-mediated anchoring. *Genes Dev.* 22, 3363–3374.

Eeftens, J.M., Katan, A.J., Kschonsak, M., Hassler, M., de Wilde, L., Dief, E.M., Haering, C.H., and Dekker, C. (2016). Condensin Smc2-Smc4 Dimers Are Flexible and Dynamic. *Cell Rep.* 14, 1813–1818.

Elbatsh, A.M.O., Raaijmakers, J.A., Weide, R.H. van der, Bos, J. uit de, Teunissen, H., Bravo, S., Medema, R.H., Wit, E. de, Haering, C.H., and Rowland, B.D. (2017). Condensin's ATPase Machinery Drives and Dampens Mitotic Chromosome Condensation. *BioRxiv* 216630.

Eluère, R., Varlet, I., Bernadac, A., and Simon, M. (2012). Cdk and the anillin homolog Bud4 define a new pathway regulating septin organization in yeast.

Fang, X., Luo, J., Nishihama, R., Wloka, C., Dravis, C., Travaglia, M., Iwase, M., Vallen, E.A., and Bi, E. (2010). Biphasic targeting and cleavage furrow ingression directed by the tail of a myosin II. *J. Cell Biol.* 191, 1333–1350.

Feeser, E.A., and Wolberger, C. (2008). Structural and functional studies of the Rap1 C-terminus reveal novel separation-of-function mutants. *J. Mol. Biol.* 380, 520–531.

Feldmann, E.A., and Galletto, R. (2014). The DNA-Binding Domain of Yeast Rap1 Interacts with Double-Stranded DNA in Multiple Binding Modes. *Biochemistry* 53, 7471–7483.

Feldmann, E.A., Koc, K.N., and Galletto, R. (2015a). Alternative Arrangements of Telomeric Recognition Sites Regulate the Binding Mode of the DNA-Binding Domain of Yeast Rap1. *Biophys. Chem.* 198, 1–8.

Feldmann, E.A., Bona, P.D., and Galletto, R. (2015b). The Wrapping Loop and Rap1 C-terminal (RCT) Domain of Yeast Rap1 Modulate Access to Different DNA Binding Modes. *J. Biol. Chem.* 290, 11455–11466.

- Ferreira, M.G., and Cooper, J.P. (2001). The fission yeast Taz1 protein protects chromosomes from Ku-dependent end-to-end fusions. *Mol. Cell* 7, 55–63.
- Finger, F.P., and Novick, P. (1997). Sec3p is involved in secretion and morphogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell* 8, 647–662.
- Finnigan, G.C., Booth, E.A., Duvalyan, A., Liao, E.N., and Thorner, J. (2015). The Carboxy-Terminal Tails of Septins Cdc11 and Shs1 Recruit Myosin-II Binding Factor Bni5 to the Bud Neck in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 200, 843–862.
- Flemming, W. (1882). *Zellsubstanz, kern und zelltheilung..* (Leipzig, F. C. W. Vogel).
- Foltman, M., Filali-Mouncef, Y., Crespo, D., and Sanchez-Diaz, A. (2018). Cell polarity protein Spa2 coordinates Chs2 incorporation at the division site in budding yeast. *PLoS Genet.* 14, e1007299.
- Förstemann, K., Höss, M., and Lingner, J. (2000). Telomerase-dependent repeat divergence at the 3' ends of yeast telomeres. *Nucleic Acids Res.* 28, 2690–2694.
- Freeman, K., Gwadz, M., and Shore, D. (1995). Molecular and genetic analysis of the toxic effect of RAP1 overexpression in yeast. *Genetics* 141, 1253–1262.
- Freeman, L., Aragon-Alcaide, L., and Strunnikov, A. (2000). The Condensin Complex Governs Chromosome Condensation and Mitotic Transmission of RdnA. *J. Cell Biol.* 149, 811–824.
- Fudenberg, G., Imakaev, M., Lu, C., Goloborodko, A., Abdennur, N., and Mirny, L.A. (2016). Formation of Chromosomal Domains by Loop Extrusion. *Cell Rep.* 15, 2038–2049.
- Ganji, M., Shaltiel, I.A., Bisht, S., Kim, E., Kalichava, A., Haering, C.H., and Dekker, C. (2018). Real-time imaging of DNA loop extrusion by condensin. *Science* 360, 102–105.
- Garbett, K.A., Tripathi, M.K., Cencki, B., Layer, J.H., and Weil, P.A. (2007). Yeast TFIID Serves as a Coactivator for Rap1p by Direct Protein-Protein Interaction. *Mol. Cell. Biol.* 27, 297–311.
- Gartenberg, M.R., and Smith, J.S. (2016). The Nuts and Bolts of Transcriptionally Silent Chromatin in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 203, 1563–1599.
- Gascoigne, K.E., and Cheeseman, I.M. (2013). Induced dicentric chromosome formation promotes genomic rearrangements and tumorigenesis. *Chromosome Res. Int. J. Mol. Supramol. Evol. Asp. Chromosome Biol.* 21, 407–418.
- Gaullier, G., Miron, S., Pisano, S., Buisson, R., Le Bihan, Y.-V., Tellier-Lebègue, C., Messaoud, W., Roblin, P., Guimarães, B.G., Thai, R., et al. (2016). A higher-order entity formed by the flexible assembly of RAP1 with TRF2. *Nucleic Acids Res.* 44, 1962–1976.
- Gerlich, D., Hirota, T., Koch, B., Peters, J.-M., and Ellenberg, J. (2006). Condensin I Stabilizes Chromosomes Mechanically through a Dynamic Interaction in Live Cells. *Curr. Biol.* 16, 333–344.

Ghaemmaghami, S., Huh, W.-K., Bower, K., Howson, R.W., Belle, A., Dephoure, N., O'Shea, E.K., and Weissman, J.S. (2003). Global analysis of protein expression in yeast. *Nature* 425, 737–741.

Gibcus, J.H., Samejima, K., Goloborodko, A., Samejima, I., Naumova, N., Nuebler, J., Kanemaki, M.T., Xie, L., Paulson, J.R., Earnshaw, W.C., et al. (2018). A pathway for mitotic chromosome formation. *Science* 359, eaao6135.

Gilson, E., Roberge, M., Giraldo, R., Rhodes, D., and Gasser, S.M. (1993). Distortion of the DNA Double Helix by RAP1 at Silencers and Multiple Telomeric Binding Sites. *J. Mol. Biol.* 231, 293–310.

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

Goloborodko, A., Imakaev, M.V., Marko, J.F., and Mirny, L. (2016b). Compaction and segregation of sister chromatids via active loop extrusion.

Goto, G.H., Zencir, S., Hirano, Y., Ogi, H., Ivessa, A., and Sugimoto, K. (2015). Binding of Multiple Rap1 Proteins Stimulates Chromosome Breakage Induction during DNA Replication. *PLoS Genet.* 11.

Gotta, M., Laroche, T., Formenton, A., Maillet, L., Scherthan, H., and Gasser, S.M. (1996). The clustering of telomeres and colocalization with Rap1, Sir3, and Sir4 proteins in wild-type *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Biol.* 134, 1349–1363.

Gottschling, D.E., Aparicio, O.M., Billington, B.L., and Zakian, V.A. (1990). Position effect at *S. cerevisiae* telomeres: Reversible repression of Pol II transcription. *Cell* 63, 751–762.

Graham, I.R., Haw, R.A., Spink, K.G., Halden, K.A., and Chambers, A. (1999). In Vivo Analysis of Functional Regions within Yeast Rap1p. *Mol. Cell. Biol.* 19, 7481–7490.

Griese, J.J., Witte, G., and Hopfner, K.-P. (2010). Structure and DNA binding activity of the mouse condensin hinge domain highlight common and diverse features of SMC proteins. *Nucleic Acids Res.* 38, 3454–3465.

Grossi, S., Bianchi, A., Damay, P., and Shore, D. (2001). Telomere Formation by Rap1p Binding Site Arrays Reveals End-Specific Length Regulation Requirements and Active Telomeric Recombination. *Mol. Cell. Biol.* 21, 8117–8128.

Gruber, S. (2018). SMC complexes sweeping through the chromosome: going with the flow and against the tide. *Curr. Opin. Microbiol.* 42, 96–103.

Guacci, V., Hogan, E., and Koshland, D. (1994). Chromosome condensation and sister chromatid pairing in budding yeast. *J. Cell Biol.* 125, 517–530.

Haeusler, R.A., Pratt-Hyatt, M., Good, P.D., Gipson, T.A., and Engelke, D.R. (2008). Clustering of yeast tRNA genes is mediated by specific association of condensin with tRNA gene transcription complexes. *Genes Dev.* 22, 2204–2214.

- Hardy, J., Churikov, D., Géli, V., and Simon, M.-N. (2014). Sgs1 and Sae2 promote telomere replication by limiting accumulation of ssDNA. *Nat. Commun.* 5, 5004.
- Harrison, B.D., Hoang, M.L., and Bloom, K. (2009). Persistent mechanical linkage between sister chromatids throughout anaphase. *Chromosoma* 118, 633–645.
- Hartley, P.D., and Madhani, H.D. (2009). Mechanisms that specify promoter nucleosome location and identity. *Cell* 137, 445–458.
- Hatano, Y., Naoki, K., Suzuki, A., and Ushimaru, T. (2016). Positive feedback promotes mitotic exit via the APC/C-Cdh1-separase-Cdc14 axis in budding yeast. *Cell. Signal.* 28, 1545–1554.
- Heacock, M., Spangler, E., Riha, K., Puizina, J., and Shippen, D.E. (2004). Molecular analysis of telomere fusions in Arabidopsis: multiple pathways for chromosome end-joining. *EMBO J.* 23, 2304–2313.
- Hecht, A., Strahl-Bolsinger, S., and Grunstein, M. (1996). Spreading of transcriptional repressor SIR3 from telomeric heterochromatin. *Nature* 383, 92–96.
- Henry, Y.A., Chambers, A., Tsang, J.S., Kingsman, A.J., and Kingsman, S.M. (1990). Characterisation of the DNA binding domain of the yeast RAP1 protein. *Nucleic Acids Res.* 18, 2617–2623.
- Hill, A., and Bloom, K. (1987). Genetic manipulation of centromere function. *Mol. Cell. Biol.* 7, 2397–2405.
- Hill, A., and Bloom, K. (1989). Acquisition and processing of a conditional dicentric chromosome in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 9, 1368–1370.
- Hirano, T. (2005). Condensins: organizing and segregating the genome. *Curr. Biol. CB* 15, R265-275.
- Hirano, T. (2016). Condensin-Based Chromosome Organization from Bacteria to Vertebrates. *Cell* 164, 847–857.
- Hirano, T., and Mitchison, T.J. (1993). Topoisomerase II does not play a scaffolding role in the organization of mitotic chromosomes assembled in *Xenopus* egg extracts. *J. Cell Biol.* 120, 601–612.
- Hirano, T., Funahashi, S., Uemura, T., and Yanagida, M. (1986). Isolation and characterization of *Schizosaccharomyces pombe* cutmutants that block nuclear division but not cytokinesis. *EMBO J.* 5, 2973–2979.
- Hirano, Y., Fukunaga, K., and Sugimoto, K. (2009). Rif1 and Rif2 inhibit localization of Tel1 to DNA ends. *Mol. Cell* 33, 312–322.
- Hoher, A., Ruault, M., Kaferle, P., Garnier, M., Descrimes, M., Morillon, A., and Taddei, A. (2017). Expanding heterochromatin reveals discrete subtelomeric domains delimited by chromatin landscape transitions. *BioRxiv* 187138.

Hocquet, C., Robellet, X., Modolo, L., Sun, X.-M., Burny, C., Cuylen-Haering, S., Toselli, E., Clauder-Münster, S., Steinmetz, L., Haering, C.H., et al. (2018). Condensin controls cellular RNA levels through the accurate segregation of chromosomes instead of directly regulating transcription.

Hong, Y., Sonnevile, R., Wang, B., Scheidt, V., Meier, B., Woglar, A., Demetriou, S., Labib, K., Jantsch, V., and Gartner, A. (2018a). LEM-3 is a midbody-tethered DNA nuclease that resolves chromatin bridges during late mitosis. *Nat. Commun.* *9*.

Hong, Y., Velkova, M., Silva, N., Jagut, M., Scheidt, V., Labib, K., Jantsch, V., and Gartner, A. (2018b). The conserved LEM-3/Ankle1 nuclease is involved in the combinatorial regulation of meiotic recombination repair and chromosome segregation in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS Genet.* *14*.

Hou, H., and Cooper, J.P. (2018). Stretching, scrambling, piercing and entangling: Challenges for telomeres in mitotic and meiotic chromosome segregation. *Differ. Res. Biol. Divers.* *100*, 12–20.

Houchmandzadeh, B., Marko, J.F., Chatenay, D., and Libchaber, A. (1997). Elasticity and Structure of Eukaryote Chromosomes Studied by Micromanipulation and Micropipette Aspiration. *J. Cell Biol.* *139*, 1–12.

Huberman, J.A., Zhu, J.G., Davis, L.R., and Newlon, C.S. (1988). Close association of a DNA replication origin and an ARS element on chromosome III of the yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res.* *16*, 6373–6384.

Hudson, D.F., Vagnarelli, P., Gassmann, R., and Earnshaw, W.C. (2003). Condensin is required for nonhistone protein assembly and structural integrity of vertebrate mitotic chromosomes. *Dev. Cell* *5*, 323–336.

Inoue, S.B., Takewaki, N., Takasuka, T., Mio, T., Adachi, M., Fujii, Y., Miyamoto, C., Arisawa, M., Furuichi, Y., and Watanabe, T. (1995). Characterization and gene cloning of 1,3-beta-D-glucan synthase from *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur. J. Biochem.* *231*, 845–854.

Ivanova, T., Maier, M., Missarova, A., Ziegler-Birling, C., Carey, L.B., and Mendoza, M. (2018). Budding yeast complete DNA replication after chromosome segregation begins. *BioRxiv* 407957.

Ivessa, A.S., Zhou, J.-Q., Schulz, V.P., Monson, E.K., and Zakian, V.A. (2002). *Saccharomyces Rrm3p*, a 5' to 3' DNA helicase that promotes replication fork progression through telomeric and subtelomeric DNA. *Genes Dev.* *16*, 1383–1396.

Iwase, M., Luo, J., Nagaraj, S., Longtine, M., Kim, H.B., Haarer, B.K., Caruso, C., Tong, Z., Pringle, J.R., and Bi, E. (2006). Role of a Cdc42p Effector Pathway in Recruitment of the Yeast Septins to the Presumptive Bud Site. *Mol. Biol. Cell* *17*, 1110–1125.

Johnson, A.N., and Weil, P.A. (2017). Identification of a transcriptional activation domain in yeast repressor activator protein 1 (Rap1) using an altered DNA-binding specificity variant. *J. Biol. Chem.* *292*, 5705–5723.

Johzuka, K., and Horiuchi, T. (2009). The cis Element and Factors Required for Condensin Recruitment to Chromosomes. *Mol. Cell* 34, 26–35.

Johzuka, K., Terasawa, M., Ogawa, H., Ogawa, T., and Horiuchi, T. (2006). Condensin Loaded onto the Replication Fork Barrier Site in the rRNA Gene Repeats during S Phase in a FOB1-Dependent Fashion To Prevent Contraction of a Long Repetitive Array in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 26, 2226–2236.

Kanke, M., Tahara, E., Huis in't Veld, P.J., and Nishiyama, T. (2016). Cohesin acetylation and Wapl-Pds5 oppositely regulate translocation of cohesin along DNA. *EMBO J.* 35, 2686–2698.

Kimura, K., and Hirano, T. (1997). ATP-dependent positive supercoiling of DNA by 13S condensin: a biochemical implication for chromosome condensation. *Cell* 90, 625–634.

Kinoshita, K., Kobayashi, T.J., and Hirano, T. (2015). Balancing Acts of Two HEAT Subunits of Condensin I Support Dynamic Assembly of Chromosome Axes. *Dev. Cell* 33, 94–106.

Ko, N., Nishihama, R., Tully, G.H., Ostapenko, D., Solomon, M.J., Morgan, D.O., and Pringle, J.R. (2007). Identification of Yeast IQGAP (Iqg1p) as an Anaphase-Promoting-Complex Substrate and Its Role in Actomyosin-Ring-Independent Cytokinesis. *Mol. Biol. Cell* 18, 5139–5153.

Koerber, R.T., Rhee, H.S., Jiang, C., and Pugh, B.F. (2009). Interaction of Transcriptional Regulators with Specific Nucleosomes Across the *Saccharomyces* Genome. *Mol. Cell* 35, 889–902.

König, P., Giraldo, R., Chapman, L., and Rhodes, D. (1996). The Crystal Structure of the DNA-Binding Domain of Yeast RAP1 in Complex with Telomeric DNA. *Cell* 85, 125–136.

Kschonsak, M., Merkel, F., Bisht, S., Metz, J., Rybin, V., Hassler, M., and Haering, C.H. (2017). Structural Basis for a Safety-Belt Mechanism That Anchors Condensin to Chromosomes. *Cell* 171, 588–600.e24.

Kubik, S., Bruzzone, M.J., Jacquet, P., Falcone, J.-L., Rougemont, J., and Shore, D. (2015). Nucleosome Stability Distinguishes Two Different Promoter Types at All Protein-Coding Genes in Yeast. *Mol. Cell* 60, 422–434.

Kubik, S., O'Duibhir, E., Jonge, W.J. de, Mattarocci, S., Albert, B., Falcone, J.-L., Bruzzone, M.J., Holstege, F.C.P., and Shore, D. (2018). Sequence-Directed Action of RSC Remodeler and General Regulatory Factors Modulates +1 Nucleosome Position to Facilitate Transcription. *Mol. Cell* 71, 89–102.e5.

Kuilman, T., Maiolica, A., Godfrey, M., Scheidel, N., Aebersold, R., and Uhlmann, F. (2015). Identification of Cdk targets that control cytokinesis. *EMBO J.* 34, 81–96.

Kumar, R., Grosbart, M., Nurse, P., Bahng, S., Wyman, C.L., and Mariani, K.J. (2017). The bacterial condensin MukB compacts DNA by sequestering supercoils and stabilizing topologically isolated loops. *J. Biol. Chem.* 292, 16904–16920.

Kyrion, G., Boakye, K.A., and Lustig, A.J. (1992). C-terminal truncation of RAP1 results in the deregulation of telomere size, stability, and function in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* *12*, 5159–5173.

de Lange, T. (2018). Shelterin-Mediated Telomere Protection. *Annu. Rev. Genet.* *52*, null.

Larionov, V.L., Karpova, T.S., Kouprina, N.Y., and Jouravleva, G.A. (1985). A mutant of *Saccharomyces cerevisiae* with impaired maintenance of centromeric plasmids. *Curr. Genet.* *10*, 15–20.

Lavoie, B.D., Tuffo, K.M., Oh, S., Koshland, D., and Holm, C. (2000). Mitotic Chromosome Condensation Requires Brn1p, the Yeast Homologue of Barren. *Mol. Biol. Cell* *11*, 1293–1304.

Lavoie, B.D., Hogan, E., and Koshland, D. (2002). In vivo dissection of the chromosome condensation machinery. *J. Cell Biol.* *156*, 805–815.

Lavoie, B.D., Hogan, E., and Koshland, D. (2004). In vivo requirements for rDNA chromosome condensation reveal two cell-cycle-regulated pathways for mitotic chromosome folding. *Genes Dev.* *18*, 76–87.

Layer, J.H., and Weil, P.A. (2013). Direct TFIIA-TFIID Protein Contacts Drive Budding Yeast Ribosomal Protein Gene Transcription. *J. Biol. Chem.* *288*, 23273–23294.

Layer, J.H., Miller, S.G., and Weil, P.A. (2010). Direct Transactivator-Transcription Factor IID (TFIID) Contacts Drive Yeast Ribosomal Protein Gene Transcription. *J. Biol. Chem.* *285*, 15489–15499.

Lazar-Stefanita, L., Scolari, V.F., Mercy, G., Muller, H., Guérin, T.M., Thierry, A., Mozziconacci, J., and Koszul, R. (2017). Cohesins and condensins orchestrate the 4D dynamics of yeast chromosomes during the cell cycle. *EMBO J.* e201797342.

Le Bihan, Y.-V., Matot, B., Pietrement, O., Giraud-Panis, M.-J., Gasparini, S., Le Cam, E., Gilson, E., Sclavi, B., Miron, S., and Le Du, M.-H. (2013). Effect of Rap1 binding on DNA distortion and potassium permanganate hypersensitivity. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* *69*, 409–419.

Lee, P.R., Song, S., Ro, H.-S., Park, C.J., Lippincott, J., Li, R., Pringle, J.R., De Virgilio, C., Longtine, M.S., and Lee, K.S. (2002). Bni5p, a Septin-Interacting Protein, Is Required for Normal Septin Function and Cytokinesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* *22*, 6906–6920.

Leibowitz, M.L., Zhang, C.-Z., and Pellman, D. (2015). Chromothripsis: A New Mechanism for Rapid Karyotype Evolution. *Annu. Rev. Genet.* *49*, 183–211.

Leonard, J., Sen, N., Torres, R., Sutani, T., Jarmuz, A., Shirahige, K., and Aragón, L. (2015). Condensin Relocalization from Centromeres to Chromosome Arms Promotes Top2 Recruitment during Anaphase. *Cell Rep.* *13*, 2336–2344.

Leung, C.C.Y., and Glover, J.M. (2011). BRCT domains. *Cell Cycle* *10*, 2461–2470.

Levy, D.L., and Blackburn, E.H. (2004). Counting of Rif1p and Rif2p on *Saccharomyces cerevisiae* Telomeres Regulates Telomere Length. *Mol. Cell. Biol.* *24*, 10857–10867.

Lieb, J.D., Liu, X., Botstein, D., and Brown, P.O. (2001). Promoter-specific binding of Rap1 revealed by genome-wide maps of protein-DNA association. *Nat. Genet.* *28*, 327–334.

Lipp, J.J., Hirota, T., Poser, I., and Peters, J.-M. (2007). Aurora B controls the association of condensin I but not condensin II with mitotic chromosomes. *J. Cell Sci.* *120*, 1245–1255.

Lopez, V., Barinova, N., Onishi, M., Pobiega, S., Pringle, J.R., Dubrana, K., and Marcand, S. (2015). Cytokinesis breaks dicentric chromosomes preferentially at pericentromeric regions and telomere fusions. *Genes Dev.* *29*, 322–336.

Lord, M., Laves, E., and Pollard, T.D. (2005). Cytokinesis Depends on the Motor Domains of Myosin-II in Fission Yeast but Not in Budding Yeast. *Mol. Biol. Cell* *16*, 5346–5355.

Losada, A., and Hirano, T. (2005). Dynamic molecular linkers of the genome: the first decade of SMC proteins. *Genes Dev.* *19*, 1269–1287.

Luo, J., Sun, X., Cormack, B.P., and Boeke, J.D. (2018). Karyotype engineering by chromosome fusion leads to reproductive isolation in yeast. *Nature* *560*, 392–396.

Luo, K., Vega-Palas, M.A., and Grunstein, M. (2002). Rap1–Sir4 binding independent of other Sir, yKu, or histone interactions initiates the assembly of telomeric heterochromatin in yeast. *Genes Dev.* *16*, 1528–1539.

Machín, F., Torres-Rosell, J., Jarmuz, A., and Aragón, L. (2005). Spindle-independent condensation-mediated segregation of yeast ribosomal DNA in late anaphase. *J. Cell Biol.* *168*, 209–219.

Machín, F., Torres-Rosell, J., De Piccoli, G., Carballo, J.A., Cha, R.S., Jarmuz, A., and Aragón, L. (2006). Transcription of ribosomal genes can cause nondisjunction. *J. Cell Biol.* *173*, 893–903.

Machín, F., Quevedo, O., Ramos-Pérez, C., and García-Luis, J. (2016). Cdc14 phosphatase: warning, no delay allowed for chromosome segregation! *Curr. Genet.* *62*, 7–13.

Maciejowski, J., and de Lange, T. (2017). Telomeres in cancer: tumour suppression and genome instability. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *18*, 175–186.

Maciejowski, J., Li, Y., Bosco, N., Campbell, P.J., and de Lange, T. (2015). Chromothripsis and Kataegis Induced by Telomere Crisis. *Cell* *163*, 1641–1654.

Marcand, S., Gilson, E., and Shore, D. (1997). A protein-counting mechanism for telomere length regulation in yeast. *Science* *275*, 986–990.

Marcand, S., Brevet, V., and Gilson, E. (1999). Progressive cis-inhibition of telomerase upon telomere elongation. *EMBO J.* *18*, 3509–3519.

Marcand, S., Pardo, B., Gratias, A., Cahun, S., and Callebaut, I. (2008). Multiple pathways

inhibit NHEJ at telomeres. *Genes Dev.* 22, 1153–1158.

Marko, J.F. (2008). Micromechanical studies of mitotic chromosomes. *Chromosome Res.* 16, 469.

Marko, J., Biggs, R., Sun, M., and Hornick, J. (2018a). Condensin controls mitotic chromosome stiffness and stability without forming a structurally contiguous scaffold. *BioRxiv* 384982.

Marko, J.F., Rios, P.D.L., Barducci, A., and Gruber, S. (2018b). DNA-segment-capture model for loop extrusion by structural maintenance of chromosome (SMC) protein complexes. *BioRxiv* 325373.

Marotta, M., Chen, X., Watanabe, T., Faber, P.W., Diede, S.J., Tapscott, S., Tubbs, R., Kondratova, A., Stephens, R., and Tanaka, H. (2013). Homology-mediated end-capping as a primary step of sister chromatid fusion in the breakage-fusion-bridge cycles. *Nucleic Acids Res.* 41, 9732–9740.

Masgrau, A., Battola, A., Sanmartin, T., Prysycz, L.P., Gabaldón, T., and Mendoza, M. (2017). Distinct roles of the polarity factors Boi1 and Boi2 in the control of exocytosis and abscission in budding yeast. *Mol. Biol. Cell* 28, 3082–3094.

Matos, J., and West, S.C. (2014). Holliday junction resolution: regulation in space and time. *DNA Repair* 19, 176–181.

Matot, B., Le Bihan, Y.-V., Lescasse, R., Pérez, J., Miron, S., David, G., Castaing, B., Weber, P., Raynal, B., Zinn-Justin, S., et al. (2012). The orientation of the C-terminal domain of the *Saccharomyces cerevisiae* Rap1 protein is determined by its binding to DNA. *Nucleic Acids Res.* 40, 3197–3207.

Mazanka, E., Alexander, J., Yeh, B.J., Charoenpong, P., Lowery, D.M., Yaffe, M., and Weiss, E.L. (2008). The NDR/LATS Family Kinase Cbk1 Directly Controls Transcriptional Asymmetry. *PLoS Biol.* 6.

Mazur, P., and Baginsky, W. (1996). In Vitro Activity of 1,3- β -D-Glucan Synthase Requires the GTP-binding Protein Rho1. *J. Biol. Chem.* 271, 14604–14609.

McClintock, B. (1941). The Stability of Broken Ends of Chromosomes in *Zea Mays*. *Genetics* 26, 234–282.

McClintock, B. (1942). The Fusion of Broken Ends of Chromosomes Following Nuclear Fusion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 28, 458–463.

McMurray, M.A., and Thorner, J. (2009). Septins: molecular partitioning and the generation of cellular asymmetry. *Cell Div.* 4, 18.

Meitinger, F., and Palani, S. (2016). Actomyosin ring driven cytokinesis in budding yeast. *Semin. Cell Dev. Biol.* 53, 19–27.

Mendoza, M., Norden, C., Durrer, K., Rauter, H., Uhlmann, F., and Barral, Y. (2009). A

mechanism for chromosome segregation sensing by the NoCut checkpoint. *Nat. Cell Biol.* *11*, 477–483.

Mieczkowski, P.A., Mieczkowska, J.O., Dominska, M., and Petes, T.D. (2003). Genetic regulation of telomere-telomere fusions in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *100*, 10854–10859.

Miller, K.M., Ferreira, M.G., and Cooper, J.P. (2005). Taz1, Rap1 and Rif1 act both interdependently and independently to maintain telomeres. *EMBO J.* *24*, 3128–3135.

Miller, K.M., Rog, O., and Cooper, J.P. (2006). Semi-conservative DNA replication through telomeres requires Taz1. *Nature* *440*, 824–828.

Mizuno, T., Kishimoto, T., Shinzato, T., Haw, R., Chambers, A., Wood, J., Sinclair, D., and Uemura, H. (2004). Role of the N-terminal region of Rap1p in the transcriptional activation of glycolytic genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* *21*, 851–866.

Moretti, P., Freeman, K., Coodly, L., and Shore, D. (1994). Evidence that a complex of SIR proteins interacts with the silencer and telomere-binding protein RAP1. *Genes Dev.* *8*, 2257–2269.

Mukherjee, K., Pandey, D.M., and Vidyarthi, A.S. (2012). Molecular Dynamics Simulation of Rap1 Myb-type domain in *Saccharomyces cerevisiae*. *Bioinformation* *8*, 881–885.

Muller, H.J., and Altenburg, E. (1930). The Frequency of Translocations Produced by X-Rays in *Drosophila*. *Genetics* *15*, 283–311.

Muller, H., Scolari, V.F., Agier, N., Piazza, A., Thierry, A., Mercy, G., Descorps-Declere, S., Lazar-Stefanita, L., Espeli, O., Llorente, B., et al. (2018). Characterizing meiotic chromosomes' structure and pairing using a designer sequence optimized for Hi-C. *Mol. Syst. Biol.* *14*, e8293.

Myung, K., Chen, C., and Kolodner, R.D. (2001). Multiple pathways cooperate in the suppression of genome instability in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature* *411*, 1073–1076.

Nakazawa, N., Mehrotra, R., Ebe, M., and Yanagida, M. (2011). Condensin phosphorylated by the Aurora-B-like kinase Ark1 is continuously required until telophase in a mode distinct from Top2. *J. Cell Sci.* *124*, 1795–1807.

Nasmyth, K. (2001). Disseminating the genome: joining, resolving, and separating sister chromatids during mitosis and meiosis. *Annu. Rev. Genet.* *35*, 673–745.

Nasmyth, K., and Haering, C.H. (2005). The structure and function of SMC and kleisin complexes. *Annu. Rev. Biochem.* *74*, 595–648.

Negrini, S., Ribaud, V., Bianchi, A., and Shore, D. (2007). DNA breaks are masked by multiple Rap1 binding in yeast: implications for telomere capping and telomerase regulation. *Genes Dev.* *21*, 292–302.

Nerusheva, O.O., Galander, S., Fernius, J., Kelly, D., and Marston, A.L. (2014). Tension-

dependent removal of pericentromeric shugoshin is an indicator of sister chromosome biorientation. *Genes Dev.* 28, 1291–1309.

Newport, J., and Spann, T. (1987). Disassembly of the nucleus in mitotic extracts: membrane vesicularization, lamin disassembly, and chromosome condensation are independent processes. *Cell* 48, 219–230.

Nicklas, R.B. (1983). Measurements of the force produced by the mitotic spindle in anaphase. *J. Cell Biol.* 97, 542–548.

Norden, C., Mendoza, M., Dobbelaere, J., Kotwaliwale, C.V., Biggins, S., and Barral, Y. (2006). The NoCut Pathway Links Completion of Cytokinesis to Spindle Midzone Function to Prevent Chromosome Breakage. *Cell* 125, 85–98.

Oh, Y., and Bi, E. (2011). Septin structure and function in yeast and beyond. *Trends Cell Biol.* 21, 141–148.

Ong, K., Wloka, C., Okada, S., Svitkina, T., and Bi, E. (2014). Architecture and dynamic remodeling of the septin cytoskeleton during the cell cycle. *Nat. Commun.* 5, 5698.

Onishi, M., Ko, N., Nishihama, R., and Pringle, J.R. (2013). Distinct roles of Rho1, Cdc42, and Cyk3 in septum formation and abscission during yeast cytokinesis. *J. Cell Biol.* 202, 311–329.

Ouspenski, I.I., Cabello, O.A., and Brinkley, B.R. (2000). Chromosome Condensation Factor Brn1p Is Required for Chromatid Separation in Mitosis. *Mol. Biol. Cell* 11, 1305–1313.

Palladino, F., Laroche, T., Gilson, E., Axelrod, A., Pillus, L., and Gasser, S.M. (1993). SIR3 and SIR4 proteins are required for the positioning and integrity of yeast telomeres. *Cell* 75, 543–555.

Palou, R., Dhanaraman, T., Marrakchi, R., Pascariu, M., Tyers, M., and D'Amours, D. (2018). Condensin ATPase motifs contribute differentially to the maintenance of chromosome morphology and genome stability. *PLoS Biol.* 16, e2003980.

Pampalona, J., Roscioli, E., Silkworth, W.T., Bowden, B., Genescà, A., Tusell, L., and Cimini, D. (2016). Chromosome Bridges Maintain Kinetochore-Microtubule Attachment throughout Mitosis and Rarely Break during Anaphase. *PLoS ONE* 11.

Pardo, B., and Marcand, S. (2005). Rap1 prevents telomere fusions by nonhomologous end joining. *EMBO J.* 24, 3117–3127.

Paul, M.R., Markowitz, T.E., Hochwagen, A., and Ercan, S. (2018). Condensin Depletion Causes Genome Decompaction Without Altering the Level of Global Gene Expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*.

Pennaneach, V., and Kolodner, R.D. (2009). Stabilization of dicentric translocations through secondary rearrangements mediated by multiple mechanisms in *S. cerevisiae*. *PloS One* 4, e6389.

Peplowska, K., Wallek, A.U., and Storchova, Z. (2014). Sgo1 Regulates Both Condensin and Ipl1/Aurora B to Promote Chromosome Biorientation. *PLOS Genet.* *10*, e1004411.

Petes, T.D. (1979). Yeast ribosomal DNA genes are located on chromosome XII. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *76*, 410–414.

Piazza, I., Haering, C.H., and Rutkowska, A. (2013). Condensin: crafting the chromosome landscape. *Chromosoma* *122*, 175–190.

Piazza, I., Rutkowska, A., Ori, A., Walczak, M., Metz, J., Pelechano, V., Beck, M., and Haering, C.H. (2014). Association of condensin with chromosomes depends on DNA binding by its HEAT-repeat subunits. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *21*, 560–568.

Piskadlo, E., Tavares, A., and Oliveira, R.A. (2017). Metaphase chromosome structure is dynamically maintained by condensin I-directed DNA (de)catenation. *ELife* *6*.

Platt, J.M., Ryvkin, P., Wanat, J.J., Donahue, G., Ricketts, M.D., Barrett, S.P., Waters, H.J., Song, S., Chavez, A., Abdallah, K.O., et al. (2013). Rap1 relocation contributes to the chromatin-mediated gene expression profile and pace of cell senescence. *Genes Dev.* *27*, 1406–1420.

Pobiega, S., and Marcand, S. (2010). Dicentric breakage at telomere fusions. *Genes Dev.* *24*, 720–733.

Poonperm, R., Takata, H., Uchiyama, S., and Fukui, K. (2017). Interdependency and phosphorylation of KIF4 and condensin I are essential for organization of chromosome scaffold. *PLoS ONE* *12*.

Proctor, S.A., Minc, N., Boudaoud, A., and Chang, F. (2012). Contributions of Turgor Pressure, the Contractile Ring, and Septum Assembly to Forces in Cytokinesis in Fission Yeast. *Curr. Biol.* *22*, 1601–1608.

Quevedo, O., García-Luis, J., Matos-Perdomo, E., Aragón, L., and Machín, F. (2012). Nondisjunction of a single chromosome leads to breakage and activation of DNA damage checkpoint in G2. *PLoS Genet.* *8*, e1002509.

Rabl, C. (1887). *Über Zelltheilung.* (Leipzig: W. Engelmann).

Ray, A., and Runge, K.W. (1998). The C Terminus of the Major Yeast Telomere Binding Protein Rap1p Enhances Telomere Formation. *Mol. Cell. Biol.* *18*, 1284–1295.

Ray, A., and Runge, K.W. (1999a). The Yeast Telomere Length Counting Machinery Is Sensitive to Sequences at the Telomere-Nontelomere Junction. *Mol. Cell. Biol.* *19*, 31–45.

Ray, A., and Runge, K.W. (1999b). Varying the number of telomere-bound proteins does not alter telomere length in *tel1Δ* cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *96*, 15044–15049.

Renauld, H., Aparicio, O.M., Zierath, P.D., Billington, B.L., Chhablani, S.K., and Gottschling, D.E. (1993). Silent domains are assembled continuously from the telomere and are defined by promoter distance and strength, and by SIR3 dosage. *Genes Dev.* *7*, 1133–

Renshaw, M.J., Ward, J.J., Kanemaki, M., Natsume, K., Nédélec, F.J., and Tanaka, T.U. (2010). Condensins Promote Chromosome Recoiling during Early Anaphase to Complete Sister Chromatid Separation. *Dev. Cell* 19, 232–244.

Rhee, H.S., and Pugh, B.F. (2011). Comprehensive Genome-wide Protein-DNA Interactions Detected at Single-Nucleotide Resolution. *Cell* 147, 1408–1419.

Ribeiro, S.A., Gatlin, J.C., Dong, Y., Joglekar, A., Cameron, L., Hudson, D.F., Farr, C.J., McEwen, B.F., Salmon, E.D., Earnshaw, W.C., et al. (2009). Condensin Regulates the Stiffness of Vertebrate Centromeres. *Mol. Biol. Cell* 20, 2371–2380.

Riggs, A.D. (1990). DNA methylation and late replication probably aid cell memory, and type I DNA reeling could aid chromosome folding and enhancer function. *Phil Trans R Soc Lond B* 326, 285–297.

Robellet, X., Thattikota, Y., Wang, F., Wee, T.-L., Pascariu, M., Shankar, S., Bonneil, É., Brown, C.M., and D’Amours, D. (2015). A high-sensitivity phospho-switch triggered by Cdk1 governs chromosome morphogenesis during cell division. *Genes Dev.* 29, 426–439.

Robellet, X., Vanoosthuysen, V., and Bernard, P. (2017). The loading of condensin in the context of chromatin. *Curr. Genet.* 63, 577–589.

Rosebrock, A.P. (2017). Synchronization and Arrest of the Budding Yeast Cell Cycle Using Chemical and Genetic Methods. *Cold Spring Harb. Protoc.* 2017.

Rossetti, L., Cacchione, S., De Menna, A., Chapman, L., Rhodes, D., and Savino, M. (2001). Specific interactions of the telomeric protein rap1p with nucleosomal binding sites¹Edited by A. Klug. *J. Mol. Biol.* 306, 903–913.

Ruault, M., Meyer, A.D., Loiodice, I., and Taddei, A. (2011). Clustering heterochromatin: Sir3 promotes telomere clustering independently of silencing in yeast. *J. Cell Biol.* 192, 417–431.

Ryan, M.P., Stafford, G.A., Yu, L., and Morse, R.H. (2000). Artificially Recruited TATA-Binding Protein Fails To Remodel Chromatin and Does Not Activate Three Promoters That Require Chromatin Remodeling. *Mol. Cell. Biol.* 20, 5847–5857.

Sabatier, L., Ricoul, M., Pottier, G., and Murnane, J.P. (2005). The loss of a single telomere can result in instability of multiple chromosomes in a human tumor cell line. *Mol. Cancer Res. MCR* 3, 139–150.

Saka, Y., Sutani, T., Yamashita, Y., Saitoh, S., Takeuchi, M., Nakaseko, Y., and Yanagida, M. (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.

Santos-Rosa, H., Bannister, A.J., Dehe, P.M., Géli, V., and Kouzarides, T. (2004). Methylation of H3 lysine 4 at euchromatin promotes Sir3p association with heterochromatin. *J. Biol. Chem.* 279, 47506–47512.

- de los Santos-Velázquez, A.I., de Oya, I.G., Manzano-López, J., and Monje-Casas, F. (2017). Late rDNA Condensation Ensures Timely Cdc14 Release and Coordination of Mitotic Exit Signaling with Nucleolar Segregation. *Curr. Biol.* *27*, 3248–3263.e5.
- Sarthy, J., Bae, N.S., Scrafford, J., and Baumann, P. (2009). Human RAP1 inhibits non-homologous end joining at telomeres. *EMBO J.* *28*, 3390–3399.
- Schalbetter, S.A., Goloborodko, A., Fudenberg, G., Belton, J.-M., Miles, C., Yu, M., Dekker, J., Mirny, L., and Baxter, J. (2017). SMC complexes differentially compact mitotic chromosomes according to genomic context. *Nat. Cell Biol.* *19*, 1071–1080.
- Schiklenk, C., Petrova, B., Kschonsak, M., Hassler, M., Klein, C., Gibson, T.J., and Haering, C.H. (2018). Control of mitotic chromosome condensation by the fission yeast transcription factor Zas1. *J. Cell Biol.* *217*, 2383–2401.
- Schmidt, M., Bowers, B., Varma, A., Roh, D.-H., and Cabib, E. (2002). In budding yeast, contraction of the actomyosin ring and formation of the primary septum at cytokinesis depend on each other. *J. Cell Sci.* *115*, 293–302.
- Selvarajah, S., Yoshimoto, M., Park, P.C., Maire, G., Paderova, J., Bayani, J., Lim, G., Al-Romaih, K., Squire, J.A., and Zielenska, M. (2006). The breakage–fusion–bridge (BFB) cycle as a mechanism for generating genetic heterogeneity in osteosarcoma. *Chromosoma* *115*, 459–467.
- Sen, N., Leonard, J., Torres, R., Garcia-Luis, J., Palou-Marin, G., and Aragón, L. (2016). Physical Proximity of Sister Chromatids Promotes Top2-Dependent Intertwining. *Mol. Cell* *64*, 134–147.
- Sfeir, A., Kosiyatrakul, S.T., Hockemeyer, D., MacRae, S.L., Karlseder, J., Schildkraut, C.L., and de Lange, T. (2009). Mammalian telomeres resemble fragile sites and require TRF1 for efficient replication. *Cell* *138*, 90–103.
- Shao, Y., Lu, N., Wu, Z., Cai, C., Wang, S., Zhang, L.-L., Zhou, F., Xiao, S., Liu, L., Zeng, X., et al. (2018). Creating a functional single-chromosome yeast. *Nature* *560*, 331–335.
- Shaw, J.A., Mol, P.C., Bowers, B., Silverman, S.J., Valdivieso, M.H., Durán, A., and Cabib, E. (1991). The function of chitin synthases 2 and 3 in the *Saccharomyces cerevisiae* cell cycle. *J. Cell Biol.* *114*, 111–123.
- Shcheprova, Z., Baldi, S., Frei, S.B., Gonnet, G., and Barral, Y. (2008). A mechanism for asymmetric segregation of age during yeast budding. *Nature* *454*, 728–734.
- Shi, T., Bunker, R.D., Mattarocci, S., Ribeyre, C., Faty, M., Gut, H., Scrima, A., Rass, U., Rubin, S.M., Shore, D., et al. (2013). Rif1 and Rif2 Shape Telomere Function and Architecture through Multivalent Rap1 Interactions. *Cell* *153*, 1340–1353.
- Shintomi, K., Takahashi, T.S., and Hirano, T. (2015). Reconstitution of mitotic chromatids with a minimum set of purified factors. *Nat. Cell Biol.* *17*, 1014–1023.
- Shintomi, K., Inoue, F., Watanabe, H., Ohsumi, K., Ohsugi, M., and Hirano, T. (2017).

Mitotic chromosome assembly despite nucleosome depletion in *Xenopus* egg extracts. *Science* 356, 1284–1287.

Shore, D., and Nasmyth, K. (1987). Purification and cloning of a DNA binding protein from yeast that binds to both silencer and activator elements. *Cell* 51, 721–732.

Simon, M.-N., Churikov, D., and Géli, V. (2016). Replication stress as a source of telomere recombination during replicative senescence in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res.* 16.

Soh, Y.-M., Bürmann, F., Shin, H.-C., Oda, T., Jin, K.S., Toseland, C.P., Kim, C., Lee, H., Kim, S.J., Kong, M.-S., et al. (2015). Molecular basis for SMC rod formation and its dissolution upon DNA binding. *Mol. Cell* 57, 290–303.

Song, W., Gawel, M., Dominska, M., Greenwell, P.W., Hazkani-Covo, E., Bloom, K., and Petes, T.D. (2013). Nonrandom distribution of interhomolog recombination events induced by breakage of a dicentric chromosome in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 194, 69–80.

van Steensel, B., Smogorzewska, A., and de Lange, T. (1998). TRF2 Protects Human Telomeres from End-to-End Fusions. *Cell* 92, 401–413.

Stewenius, Y., Gorunova, L., Jonson, T., Larsson, N., Höglund, M., Mandahl, N., Mertens, F., Mitelman, F., and Gisselsson, D. (2005). Structural and numerical chromosome changes in colon cancer develop through telomere-mediated anaphase bridges, not through mitotic multipolarity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 5541–5546.

Stimpson, K.M., Matheny, J.E., and Sullivan, B.A. (2012). Dicentric chromosomes: unique models to study centromere function and inactivation. *Chromosome Res.* 20, 595–605.

St-Pierre, J., Douziech, M., Bazile, F., Pascariu, M., Bonneil, E., Sauvé, V., Ratsima, H., and D'Amours, D. (2009). Polo kinase regulates mitotic chromosome condensation by hyperactivation of condensin DNA supercoiling activity. *Mol. Cell* 34, 416–426.

Strick, T.R., Kawaguchi, T., and Hirano, T. (2004). Real-time detection of single-molecule DNA compaction by condensin I. *Curr. Biol. CB* 14, 874–880.

Strunnikov, A.V., Hogan, E., and Koshland, D. (1995). SMC2, a *Saccharomyces cerevisiae* gene essential for chromosome segregation and condensation, defines a subgroup within the SMC family. *Genes Dev.* 9, 587–599.

Sundin, O., and Varshavsky, A. (1980). Terminal stages of SV40 DNA replication proceed via multiply intertwined catenated dimers. *Cell* 21, 103–114.

Sutani, T., Yuasa, T., Tomonaga, T., Dohmae, N., Takio, K., and Yanagida, M. (1999). Fission yeast condensin complex: essential roles of non-SMC subunits for condensation and Cdc2 phosphorylation of Cut3/SMC4. *Genes Dev.* 13, 2271–2283.

Sutani, T., Sakata, T., Nakato, R., Masuda, K., Ishibashi, M., Yamashita, D., Suzuki, Y., Hirano, T., Bando, M., and Shirahige, K. (2015). Condensin targets and reduces unwound DNA structures associated with transcription in mitotic chromosome condensation. *Nat.*

Commun. 6, 7815.

Suto, Y., Hirai, M., Akiyama, M., Kobashi, G., Itokawa, M., Akashi, M., and Sugiura, N. (2013). Biodosimetry of restoration workers for the Tokyo Electric Power Company (TEPCO) Fukushima Daiichi nuclear power station accident. *Health Phys.* 105, 366–373.

Swedlow, J.R., Sedat, J.W., and Agard, D.A. (1993). Multiple chromosomal populations of topoisomerase II detected in vivo by time-lapse, three-dimensional wide-field microscopy. *Cell* 73, 97–108.

Swygert, S.G., Kim, S., Wu, X., Fu, T., Hsieh, T.-H., Rando, O.J., Eisenman, R.N., Shendure, J., McKnight, J.N., and Tsukiyama, T. (2018). Condensin-dependent chromatin condensation represses transcription globally during quiescence. *BioRxiv* 320895.

Taddei, A., Hediger, F., Neumann, F.R., Bauer, C., and Gasser, S.M. (2004). Separation of silencing from perinuclear anchoring functions in yeast Ku80, Sir4 and Esc1 proteins. *EMBO J.* 23, 1301–1312.

Tanaka, K., Mukae, N., Dewar, H., Breugel, M. van, James, E.K., Prescott, A.R., Antony, C., and Tanaka, T.U. (2005). Molecular mechanisms of kinetochore capture by spindle microtubules. *Nature* 434, 987–994.

Terakawa, T., Bisht, S., Eeftens, J.M., Dekker, C., Haering, C.H., and Greene, E.C. (2017). The condensin complex is a mechanochemical motor that translocates along DNA. *Science* eaan6516.

Thadani, R., and Uhlmann, F. (2015). Chromosome Condensation: Weaving an Untangled Web. *Curr. Biol.* 25, R663–R666.

Thadani, R., Kamenz, J., Heeger, S., Muñoz, S., and Uhlmann, F. (2018). Cell-Cycle Regulation of Dynamic Chromosome Association of the Condensin Complex. *Cell Rep.* 23, 2308–2317.

Thattikota, Y., Tollis, S., Palou, R., Vinet, J., Tyers, M., and D’Amours, D. (2018). Cdc48/VCP Promotes Chromosome Morphogenesis by Releasing Condensin from Self-Entrapment in Chromatin. *Mol. Cell* 69, 664-676.e5.

Thomas, G.E., Renjith, M.R., and Manna, T.K. (2017). Kinetochore-microtubule interactions in chromosome segregation: lessons from yeast and mammalian cells. *Biochem. J.* 474, 3559–3577.

Thomas, R., Marks, D.H., Chin, Y., and Benezra, R. (2018). Whole chromosome loss and associated breakage–fusion–bridge cycles transform mouse tetraploid cells. *EMBO J.* 37, 201–218.

Thrower, D.A., and Bloom, K. (2001). Dicentric Chromosome Stretching during Anaphase Reveals Roles of Sir2/Ku in Chromatin Compaction in Budding Yeast. *Mol. Biol. Cell* 12, 2800–2812.

Titos, I., Ivanova, T., and Mendoza, M. (2014). Chromosome length and perinuclear

attachment constrain resolution of DNA intertwinings. *J. Cell Biol.* 206, 719–733.

Tolliday, N., Pitcher, M., and Li, R. (2003). Direct Evidence for a Critical Role of Myosin II in Budding Yeast Cytokinesis and the Evolvability of New Cytokinetic Mechanisms in the Absence of Myosin II. *Mol. Biol. Cell* 14, 798–809.

Tomar, R.S., Zheng, S., Brunke-Reese, D., Wolcott, H.N., and Reese, J.C. (2008). Yeast Rap1 contributes to genomic integrity by activating DNA damage repair genes. *EMBO J.* 27, 1575–1584.

Torres, J.Z., Schnakenberg, S.L., and Zakian, V.A. (2004). *Saccharomyces cerevisiae* Rrm3p DNA Helicase Promotes Genome Integrity by Preventing Replication Fork Stalling: Viability of *rrm3* Cells Requires the Intra-S-Phase Checkpoint and Fork Restart Activities. *Mol. Cell. Biol.* 24, 3198–3212.

Toselli-Mollereau, E., Robellet, X., Fauque, L., Lemaire, S., Schiklenk, C., Klein, C., Hocquet, C., Legros, P., N’Guyen, L., Mouillard, L., et al. (2016). Nucleosome eviction in mitosis assists condensin loading and chromosome condensation. *EMBO J.* 35, 1565–1581.

Touati, S.A., and Uhlmann, F. A global view of substrate phosphorylation and dephosphorylation during budding yeast mitotic exit. *Microb. Cell* 5, 389–392.

Tully, G.H., Nishihama, R., Pringle, J.R., and Morgan, D.O. (2009). The Anaphase-promoting Complex Promotes Actomyosin-Ring Disassembly during Cytokinesis in Yeast. *Mol. Biol. Cell* 20, 1201–1212.

Uemura, T., Ohkura, H., Adachi, Y., Morino, K., Shiozaki, K., and Yanagida, M. (1987). DNA topoisomerase II is required for condensation and separation of mitotic chromosomes in *S. pombe*. *Cell* 50, 917–925.

Uhlmann, F., Lottspeich, F., and Nasmyth, K. (1999). Sister-chromatid separation at anaphase onset is promoted by cleavage of the cohesin subunit Scc1. *Nature* 400, 37–42.

Varela, E., Shimada, K., Laroche, T., Leroy, D., and Gasser, S.M. (2009). Lte1, Cdc14 and MEN-controlled Cdk inactivation in yeast coordinate rDNA decompaction with late telophase progression. *EMBO J.* 28, 1562–1575.

Vrabioiu, A.M., and Mitchison, T.J. (2006). Structural insights into yeast septin organization from polarized fluorescence microscopy. *Nature* 443, 466–469.

Walther, N., Hossain, M.J., Politi, A.Z., Koch, B., Kueblbeck, M., Ødegård-Fougner, Ø., Lampe, M., and Ellenberg, J. (2018). A quantitative map of human Condensins provides new insights into mitotic chromosome architecture. *J. Cell Biol.* 217, 2309–2328.

Wang, X., Hughes, A.C., Brandão, H.B., Walker, B., Lierz, C., Cochran, J.C., Oakley, M.G., Kruse, A.C., and Rudner, D.Z. (2018). In Vivo Evidence for ATPase-Dependent DNA Translocation by the *Bacillus subtilis* SMC Condensin Complex. *Mol. Cell* 71, 841–847.e5.

Weiss, E.L. (2012). Mitotic Exit and Separation of Mother and Daughter Cells. *Genetics* 192, 1165–1202.

- Wellinger, R.J., and Zakian, V.A. (2012). Everything You Ever Wanted to Know About *Saccharomyces cerevisiae* Telomeres: Beginning to End. *Genetics* 191, 1073–1105.
- Wells, J.N., Gligoris, T.G., Nasmyth, K.A., and Marsh, J.A. (2017). Evolution of condensin and cohesin complexes driven by replacement of Kite by Hawk proteins. *Curr. Biol.* 27, R17–R18.
- Williams, T.L., Levy, D.L., Maki-Yonekura, S., Yonekura, K., and Blackburn, E.H. (2010). Characterization of the Yeast Telomere Nucleoprotein Core. *J. Biol. Chem.* 285, 35814–35824.
- Wloka, C., and Bi, E. (2012). Mechanisms of cytokinesis in budding yeast. *Cytoskeleton* 69, 710–726.
- Wloka, C., Nishihama, R., Onishi, M., Oh, Y., Hanna, J., Pringle, J.R., Krauß, M., and Bi, E. (2011). Evidence that a septin diffusion barrier is dispensable for cytokinesis in budding yeast. *Biol. Chem.* 392, 813–829.
- Wood, E.R., and Earnshaw, W.C. (1990). Mitotic chromatin condensation in vitro using somatic cell extracts and nuclei with variable levels of endogenous topoisomerase II. *J. Cell Biol.* 111, 2839–2850.
- Wotton, D., and Shore, D. (1997). A novel Rap1p-interacting factor, Rif2p, cooperates with Rif1p to regulate telomere length in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev.* 11, 748–760.
- Wright, J.H., and Zakian, V.A. (1995). Protein-DNA interactions in soluble telosomes from *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res.* 23, 1454–1460.
- Xu, Z., Fallet, E., Paoletti, C., Fehrman, S., Charvin, G., and Teixeira, M.T. (2015). Two routes to senescence revealed by real-time analysis of telomerase-negative single lineages. *Nat. Commun.* 6.
- Yusuf, M., Kaneyoshi, K., Fukui, K., and Robinson, I. (2018). Use of 3D imaging for providing insights into high-order structure of mitotic chromosomes. *Chromosoma*.
- Zhang, C.-Z., Spektor, A., Cornils, H., Francis, J.M., Jackson, E.K., Liu, S., Meyerson, M., and Pellman, D. (2015). CHROMOTHRIPSIS FROM DNA DAMAGE IN MICRONUCLEI. *Nature* 522, 179–184.
- Zhang, W., Zhang, J., Zhang, X., Xu, C., and Tu, X. (2011). Solution structure of Rap1 BRCT domain from *Saccharomyces cerevisiae* reveals a novel fold. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 404, 1055–1059.
- Zhao, Y., McIntosh, K.B., Rudra, D., Schawalder, S., Shore, D., and Warner, J.R. (2006). Fine-Structure Analysis of Ribosomal Protein Gene Transcription. *Mol. Cell. Biol.* 26, 4853–4862.

Titre : Rôles des télomères internes et des condensines dans la cassure des chromosomes dicentriques par la cytotéière chez *Saccharomyces cerevisiae*

Mots clés : *S. cerevisiae*, Télomères internes, Rap1, Condensine, *Roadblock*

Les télomères garantissent la stabilité des extrémités chromosomiques. Une défaillance de protection entraîne l'apparition de chromosomes dicentriques (c-à-d. possédant deux centromères) instables en mitose. La présence de chromosomes dicentriques est donc une source de mutagenèse et une menace pour la viabilité des cellules. Chez *Saccharomyces cerevisiae*, les dicentriques issus d'une fusion de télomères cassent préférentiellement à la fusion. Ce processus inexplicé permet la régénération d'un caryotype normal et protège les chromosomes des conséquences néfastes d'une fusion accidentelle de leurs extrémités. Ce manuscrit explore les mécanismes moléculaires de cette voie de secours. La haute affinité de Rap1, pour ses sites consensus en tandem ou pour des séquences télomériques est suffisantes pour former un point chaud de cassure des chromosomes dicentriques. Une protéine hétérologue ayant aussi une haute affinité fixation pour sa séquence mime la présence de fusions de télomères, montrant que la forte affinité d'une protéine pour ses sites en tandem suffit à créer un point chaud. En l'absence de séquence télomérique interne, les chromosomes dicentriques cassent plutôt aux régions péricentromériques. Ces positions de cassure dépendent d'une force générée par les Condensines capable de relocaliser rapidement les centromères des chromosomes dicentriques au site de cytotéière avant leur cassure. De plus, le repliement des chromosomes dicentriques dépendant des Condensines est également nécessaire à une cassure préférentielle aux séquences fixant Rap1. En anaphase, ces séquences forment aussi un isolateur capable de séparer deux domaines chromosomiques. Ainsi, les télomères fusionnés sont secourus par un mécanisme qui favorise une capture des fusions et des régions péricentromériques par le septum dépendant de la conformation des chromosomes dirigées par les Condensines et par Rap1. Ces résultats suggèrent que les séquences télomériques fixant Rap1 bloquent l'extrusion de boucles par Condensine. De plus ce travail propose un nouvel outil pour l'étude de la condensation *in vivo*. Il montre également que la cassure des chromosomes dicentriques survient pendant la septation et que cytotéière n'est pas ralentie par la présence d'un pont de chromatine.

Title : Roles of internal telomeres and condensins in dicentric chromosome breakage by cytokinesis in *Saccharomyces cerevisiae*

Keywords : *S. cerevisiae*, Internal Telomeres, Rap1 ; Condensin, *Roadblock*

Telomeres ensure chromosome end stability. Failure to do so would lead to chromosome end fusions and the formation dicentric chromosomes (i.e. chromosomes with two centromeres) that are unstable in mitosis. Dicentrics are a threat to cell viability and a source of extensive mutagenesis. In *Saccharomyces cerevisiae*, dicentrics formed by telomere fusion preferentially break at the fusion. This unexplained process allows the recovery of a normal karyotype and protects the genome from the detrimental consequences of accidental telomere fusions. Here, I address the molecular basis of this rescue pathway. Simple tandem arrays tightly bound by the telomere factor Rap1 or a heterologous high-affinity DNA binding factor are sufficient to establish breakage hotspots, mimicking telomere fusions within dicentrics. I also adress the mechanism allowing breakage at pericentromeric regions when dicentric do not bear telomeric sequences. During anaphase, Condensins generate forces sufficient to rapidly relocalize the centromeres to the bud neck and refold dicentrics prior their breakage by cytokinesis. This relocalisation is essential for breakage at pericentromeres. Moreover Condensin-dependent refolding is essential to the preferential breakage at telomere fusions, more generally at Rap1-bound arrays and which delimit insulated chromosomal domains. Thus, the rescue of fused telomeres results from a Condensin- and Rap1-driven chromosome conformation that favours fusion entrapment where the septum closes. These results suggest that Rap1-bound telomere sequences stall loop-extrusion by Condensins. In addition, this work provides a new and direct way to monitor Condensin activity on chromatin in live cells. It also shows that dicentric chromosomes are broken during septation and that cytokinesis is not delayed by chromatin bridges.